

# Differentielle RNA-Expression bei der Infektion von *Malus domestica* cv Florina durch *Venturia inaequalis*

**Master Thesis**

**Author(s):**

Beck, Urs

**Publication date:**

2003

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004941721>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

**Institut für Pflanzenwissenschaften, Pflanzenpathologie  
Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich**

## **Diplomarbeit**

**Differentielle RNA-Expression  
bei der Infektion von *Malus domestica cv Florina*  
durch *Venturia inaequalis***

eingereicht von  
**Urs Beck**

Zürich, Juli 2003

Referent: Herr Dr. Cesare Gessler  
Co-Referenten: Herr Dr. A. Patocchi  
Frau C. Toller

# Inhaltsverzeichnis

Seite

<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Resistenz-Typen</b>	<b>4</b>
1.1.1 Rassenspezifische Resistenz	5
1.1.2 Rassenunspezifische Resistenz	5
1.1.3 Systemisch erworbene Resistenz	5
1.1.4 Induzierte systemische Resistenz	5
<b>1.2 Resistenz-Mechanismen</b>	<b>6</b>
1.2.1 Hypersensitive Reaktion	6
1.2.2 Kalloseinduktion	6
1.2.3 Lignifizierung und andere Zellwandveränderungen	6
1.2.4 Phytoalexine	6
1.2.5 PR-Proteine	6
<b>1.3 Methoden um differentiell exprimierte Gene zu studieren</b>	<b>8</b>
1.3.1 Differential Display	8
1.3.2 RAP-PCR	9
1.3.3 Microarray	9
1.3.4 Suppressive subtraktive Hybridisation	10
1.3.5 Die molekulare Basis von PCR-Select cDNA Subtraktion	10
<b>1.4 Zielsetzung</b>	<b>12</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Gewinnung der Konidien von <i>Venturia Inaequalis</i>	13
2.2 Infektion von <i>Florina</i> Apfelbläume mit <i>Venturia Inaequalis</i>	13
2.3 Isolierung von RNA aus Apfelblätter	13
2.4 Isolierung von PolyA <sup>+</sup> RNA	16
2.5 Subtraktive Hybridisation	16
2.6 Klonierung	19
2.7 Propagation und PCR	19
2.8 Analyse der PCR Produkte und Southern Blot	20
2.9 Herstellung der Hybridisierungssonden und Hybridisierung	21
2.10 PCR und PCR-Reinigung	21
2.11 Sequenzierung	22
2.12 RNA Gelelektrophorese und Northern Blotting	23
2.13 Herstellung der Hybridisierungssonden und Hybridisierung	24
<b>3. Resultate</b>	<b>25</b>
3.1 Gesamt-RNA Extraktion	25
3.2 Isolierung der mRNA	25
3.3 PCR Select	25
3.4 Klonierung und Southern Blot	26
3.5 Resultat der Sequenzierung	27
3.6 Überprüfung der gefundenen Gene	29
3.7 Northern Blots	29

<b>4. Diskussion</b>	<b>32</b>
4.1 Methode	32
4.2.1 14-3-3 Proteine	33
4.2.2 Chitinase	33
4.2.3 Major Allergen Mal d 1	34
4.2.4 Senescence-associated Protein	34
4.2.5 Asparagin-Synthetase (ASN)	35
4.2.6 Formate dehydrogenase (FDH)	35
4.2.7 Branched chain amino acid Transaminase (BCATs)	36
4.2.8 Peroxidase	36
4.2.9 Xyloglucan Endotransglycosylase (XET)	36
4.2.10 Dehydration responsive Protein RD22	37
4.2.11 Chlorophyll a/b binding Protein (CAB Proteine)	37
4.2.12 Phospholipase D	37
4.2.13 ATP-Synthetase	37
4.2.14 Monooxygenase	38
<b>5. Ausblick</b>	<b>39</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>40</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>48</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>49</b>

# 1. Einleitung

Im Vergleich zur grossen Anzahl bekannter Mikroorganismen sind nur wenige in der Lage, lebendige Pflanzen zu befallen. Daraus kann man schliessen, dass Pflanzen über gut funktionierende und breitgefächerte Abwehrreaktionen, die zeitlich versetzt ablaufen können, verfügen. Auf diese Weise besitzen Pflanzen eine wirksame Schutzkette gegenüber den meisten Parasiten. Man unterscheidet dabei die sogenannten konstitutiven Schutzmechanismen, welche vor allem mechanische Faktoren, wie zum Beispiel die Cuticula, beinhalten und induzierbare Abwehrmechanismen.

Voraussetzung für die induzierte Abwehr ist die Erkennung des Pathogens seitens der Pflanze. Moleküle die Abwehrreaktionen auslösen, bezeichnet man als Elicitoren, wobei man biotische und abiotische Elicitoren unterscheidet. Zu letzteren gehören Chemikalien, Schwermetallionen und UV-Licht. Biotische Elicitoren stammen entweder von der Pflanze selbst (endogene Elicitoren) oder vom Pathogen (exogene Elicitoren) und sind in der Lage strukturelle und/oder biochemische Veränderungen in der Pflanze zu bewirken, die direkt mit der Ausprägung von Resistenz verknüpft sind (Dixon et al., 1994). Viele unterschiedliche Elicitoren konnten bereits identifiziert werden. Dazu gehören Saccharide, Glycoproteine, Peptide und Phospholipide (Coté und Hahn, 1994; De Wit und Spikman, 1982; Creamer und Bostock, 1986).

Die Interaktion von Elicitemolekülen mit Membranrezeptoren bewirkt eine überaus komplexe Reaktion der Pflanze, während der eine ganze Reihe von Veränderungen zu beobachten sind.

Die ersten Reaktionen nach der Elicitor-Rezeptor Interaktion sind zytologische Veränderungen, wie der Umorganisation des Zytoskeletts (Kobayashi et al., 1995, Schmelzer et al., 1995), die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die als „oxidative burst“ bezeichnet wird. Zusätzliche Reaktionen sind Permeabilitätsveränderungen der Plasmamembrane gegenüber Calciumionen, Protonen, Kalium- und Chloridionen (Benhamou, 1996).

## 1.1 Resistenz-Typen

### 1.1.1 Rassenspezifische Resistenz

Trotz des wirkungsvollen Abwehrsystems der Pflanzen, haben einzelne Pathogene Mechanismen entwickelt, um bestimmte Wirtsspezies zu parasitieren. Dadurch sind sie in der Lage, die pflanzliche Abwehr zu umgehen, zu verzögern oder unschädlich zu machen (Prell, 1996). Eine solche Pflanzen-Pathogen-Interaktion, die erfolgreich für das Pathogen verläuft, wird als kompatibel bezeichnet. Aufgrund der Koevolution zwischen Pathogenen und ihren Wirten existieren jedoch auch in Pflanzenarten, die kompatibel für ein bestimmtes Pathogen sind, einzelne Sorten, die gegen bestimmte Rassen des Pathogens resistent sind. Die rassenspezifische Resistenz ist vom Genotyp der Wirtspflanzensorte und der Pathogenrasse abhängig. Arbeiten von Flor über die Wechselwirkung von Pflanzenresistenz und Pathogenvirulenz im Pathosystem (Flachs/Flachsrost) haben zur Aufstellung der Gen-für-Gen-Hypothese geführt (Flor,

1971). Dieses allgemein anerkannte Konzept besagt, dass in einer Pflanzen-Pathogen-Interaktion, bei Vorliegen einer Grundkompatibilität, nur dann inkompatibel ist, wenn das Pathogen ein Avirulenzgen (*avr*-Gen) trägt und der Wirt ein komplementäres Resistenzgen (*R*-Gen) besitzt. Die meist monogen determinierten Phänotypen Resistenz und Avirulenz sind in der Regel dominant, was zu der Hypothese geführt hat, dass in diesen Fällen *R*-Genprodukte Rezeptoren für *avr*-Genprodukte sind (de Wit, 1997). In der Tat konnte für einige *avr*-Genprodukte gezeigt werden, dass sie als rassenspezifische Elicitoren wirken, d. h. dass ihre Applikation in resistenten Pflanzensorten eine Resistenzantwort auslöst (van den Ackerveken *et al.*, 1992; Joosten *et al.*, 1994; Wewelsiep *et al.*, 1991; Knogge, 1996).

### **1.1.2 Rassenunspezifische Resistenz**

Neben der oben beschriebenen rassenspezifischen Resistenz existiert noch die rassenunspezifische Resistenz (van der Planck, 1963, 1968), bzw. quantitative Resistenz (Watson, 1970a, 1970b), die meist von mehreren Genen gesteuert wird. In einigen Fällen sind an einer quantitativen Resistenz mehr als zehn Gene beteiligt, wie zum Beispiel der Resistenz des Weizen gegen den echten Mehltau (*Erysiphe graminis*) (Dirlewanger *et al.*, 1994; Keller *et al.*, 1999). Meistens sind es aber nur drei bis fünf (Noradi *et al.*, 1993). Die Wirkung der einzelnen Gene ist gering und wird oft von Umwelteinflüssen oder durch Epistasie beeinflusst (Lindhout, 2002). Der Befall der Pflanze wird meistens nicht vollständig verhindert, es findet lediglich eine Reduzierung der Auswirkungen in den verschiedenen Stadien des Krankheitsbefalls statt. Eine quantitative Resistenz vermindert zunächst die Wahrscheinlichkeit eines Befalls. Nach erfolgreichem Befall wird die Ausbreitung des Pathogens in der Pflanze verzögert, und das Pathogen kann nur eine verminderte Anzahl an Vermehrungsorganen bilden (Becker, 1993; Kolmer, 1996). Der Begriff der quantitativen Resistenz ist dabei nicht an einen bestimmten Wirkungsmechanismus geknüpft, sondern an die Beteiligung mehrerer Gene (Lindhout, 2002).

### **1.1.3 Systemisch erworbene Resistenz (SAR von „systemic acquired resistance“)**

Unter systemisch erworbener Resistenz versteht man die Resistenz gegen eine Nachfolgeinfektion in ursprünglich nichtinfizierten, pathogenfreien Geweben, nach einer vorausgegangenen Erstinfektion auf einem anderen Pflanzenteil. Im konkreten Fall bedeutet dies, dass z.B. die Infektion älterer Blätter einer Pflanze, mit einem bestimmten Pathogen, zur Ausbildung einer gesteigerten Resistenz in den jüngeren Nachfolgeblättern führen kann (Ros, 1961).

### **1.1.4 Induzierte systemische Resistenz (ISR von „induced systemic resistance“)**

Die induzierte systemische Resistenz beschreibt eine andere Form der erworbenen Resistenz, wie sie zum Beispiel von Rhizobakterien hervorgerufen wird. Diese Bakterien besiedeln die Wurzeloberfläche bestimmter Pflanzen und induzieren Resistenz, die in den oberirdischen Teilen wirksam ist (Sicher *et al.*, 1997).

## **1.2 Resistenz-Mechanismen**

### **1.2.1 Hypersensitive Reaktion**

Die Hypersensitive Reaktion ist definiert als lokaler und schneller Tod einer oder weniger Pflanzenzellen, als Antwort auf die Infizierung durch ein avirulentes Isolat eines Pathogens (Goodmann and Novacky, 1994). Typischerweise findet man diesen Vorgang bei Pflanzen, die resistent gegenüber dem Befall einer bestimmten biotrophen Pathogenrasse sind (Tomiyama et al., 1979). Der Krankheitserreger wird eingeschlossen und dadurch an der weiteren Ausbreitung im Gewebe gehindert (Mansfield, 1986).

Begleitet wird die hypersensitive Reaktion von weiteren Abwehrreaktionen, wie z.B. der Verstärkung der Zellwand durch zunehmende Lignifizierung und Bildung von Kallose.

### **1.2.2 Kalloseinduktion**

Die Kallosebildung ist eine sehr weit verbreitete Reaktion von Pflanzen auf Infektionen. Das 1,3- $\beta$ -Glucan wird lokal vor allem dort gebildet, wo das Pathogen in das pflanzliche Gewebe einzudringen versucht (Bell, 1981; Jahnen und Hahlbrock, 1988). Die Besonderheit dieses Vorgangs liegt in der Induktion einer Abwehrstrategie durch direkte Aktivierung der Syntheseleistung des Enzyms. Kallose wird, wie Lignin, eine Rolle als physikalische Barriere zugesprochen.

### **1.2.3 Lignifizierung und andere Zellwandveränderungen**

Die Verstärkung der Zellwand mit lignin- und suberinartigen Verbindungen ist auf die Aktivierung des Phenylpropanstoffwechsels zurückzuführen, der die Ausgangssubstanzen für ihre Synthese bereitstellt (Hahlbrock und Scheel, 1989).

Weitere Veränderungen in der Pflanzenzellwand betreffen zellwand-assoziierte Strukturproteine. Hierzu zählen Hydroxyprolin-reiche Glycoproteine, Glycin-reiche und Prolin-reiche Proteine, deren Synthese durch Pathogenbefall induziert wird. (Mazau und Esquerré-Tugayé, 1986; Cassab und Varner, 1988).

### **1.2.4 Phytoalexine**

Phytoalexine werden als antimikrobiell wirkende, niedermolekulare Substanzen definiert (Paxton, 1982), die eine strukturell sehr vielfältige Gruppe innerhalb der Pflanzenwelt darstellen (Hahlbrock und Scheel, 1987).

Die Phytoalexine leiten sich von verschiedenen Biosynthesewegen ab. Dazu gehören der Shikimat-Phenylpropanstoffwechsel (Hermann, 1995, Dixon und Paiva, 1995), der Acetat-Mevalonat- oder der Acetat-Polymalonatweg.

### 1.2.5 PR-Proteine

Als PR-Proteine („pathogenesis-related proteins“) werden Polypeptide bezeichnet, die in der gesunden Pflanze nicht akkumulieren, sondern erst nach Pathogenattacken bzw. unter bestimmten Stressbedingungen synthetisiert werden. Die PR-Proteine weisen eine große Komplexität auf und werden in 14 verschiedene Familien eingeteilt (PR 1-PR 14), (Kobrinck et al., 1995). PR 1, die zunächst aus mit TMV- infizierten Tabakblättern isoliert wurden und später auch in Tomate, Kartoffel, *Arabidopsis*, Mais, Weizen und Gerste gefunden wurden. Alle PR 1-Proteine besitzen ein N-terminales Signalpeptid, das für den Transport der Proteine ins endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist: Bisher konnte noch keine Funktion den PR 1-Proteinen zugeordnet werden.

Dagegen ist bekannt, dass die PR-Proteine der Familie 2, die 1,3-b-Glucanasen *in vitro* antifungale Wirkung zeigen (Beerhues et al., 1994; Delp, et al., 1999).

Zur Familie 3 der PR-Proteine zählen die Chitinasen, und insbesondere Chitinase II, welche das pilzliche Wachstum hemmen, indem sie die Hauptkomponenten der pilzlichen Zellwand, das Chitin (b-1,4-Nacetylglucosamin) hydrolisieren (Schlumbaum und Mauch, 1986).

Eine kleine und weniger gut untersuchte Gruppe, mit unbekannter Funktion, stellen die PR-Proteine der Familie 4 dar. Die aus Tabak und Tomate isolierten Proteine sind den wundinduzierten Proteinen Win 1 und 2 aus Kartoffeln ähnlich, wo hingegen andere PR 4-Proteine, z. B. aus *Arabidopsis*, als strukturelle Gemeinsamkeit eine chitinbindende Funktion bzw. eine Hevein-Domäne zeigen. Das Hevein, als Hauptbestandteil des Latex, stellt ein Homolog Chitin-bindender Domänen aus Pflanzen dar (Ponstein et al., 1994).

Zur Familie 5 der PR-Proteine zählen die Thaumatin-ähnlichen Proteine bzw. die Osmotine. Sie wurden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten zum Thaumatin, einem süßschmeckenden Protein, aus *Thaumatococcus daniellii*, zu einem Trypsin/a-Amylase-Inhibitor, aus Mais und zum Osmotin, aus salzgestressten Tabakzellkulturen dieser Familie zugeordnet (Liu et al., 1994).

Proteinase-Inhibitoren (Familie 6 der PR-Proteine) zählen nicht zu den klassischen PR-Proteinen, da sie nach Verwundung und Insektenfrass bzw. entwicklungspezifisch akkumulieren. Sie inhibieren die von pflanzenschädigenden Insekten abgesonderten Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteinasen, welche die Freisetzung von pflanzlichen Aminosäuren katalysieren (Schuler et al., 1998).

Weniger Bekanntes ist über die PR-Proteine der Familien 7, 8, 9 und 10 zu schreiben. Zur Familie 7 gehören pathogeninduzierte Proteinasen aus Tomate.

Familie 8 umfasst Chitinasen der Klasse III aus Gurke, Tabak, Bohne und Kichererbse, welche keine signifikante Sequenzähnlichkeit mit anderen Typen von Chitinase haben. Die pathogeninduzierten, anionischen, extrazellulären, ligninformenden Peroxidasen verschiedener Spezies, die aber auch in physiologische Prozesse involviert sind, zählen zur Familie 9.

Als intrazelluläre Proteine (IPR) werden die Proteine der Familie 10 bezeichnet, die, sowohl nach Pathogenbefall, als auch stressbedingt und entwicklungspezifisch akkumulieren, für die aber bisher keine Funktionen bekannt sind (Constabel et al., 1993). Zur Familie 11 der PR-Proteine zählen Chitinasen der Klasse V, welche signifikante Sequenzähnlichkeit mit bakteriellen Endochitinasen haben.



Antimikrobielle Peptide, die sowohl als präformierte Komponenten fungieren, als auch nach Pathogenbefall akkumulieren, sind Teil der pflanzlichen Abwehr. Zu den antimikrobiellen Peptiden zählen Defensine (Proteine der Familie 12), Thionine (Proteine der Familie 13), die durch Änderung der Membranpermeabilität antibakteriell und antifungal wirken, Lipid-Transfer-Proteine (Proteine der Familie 14) und andere Peptide (Carcia-Olmedo et al., 1998).

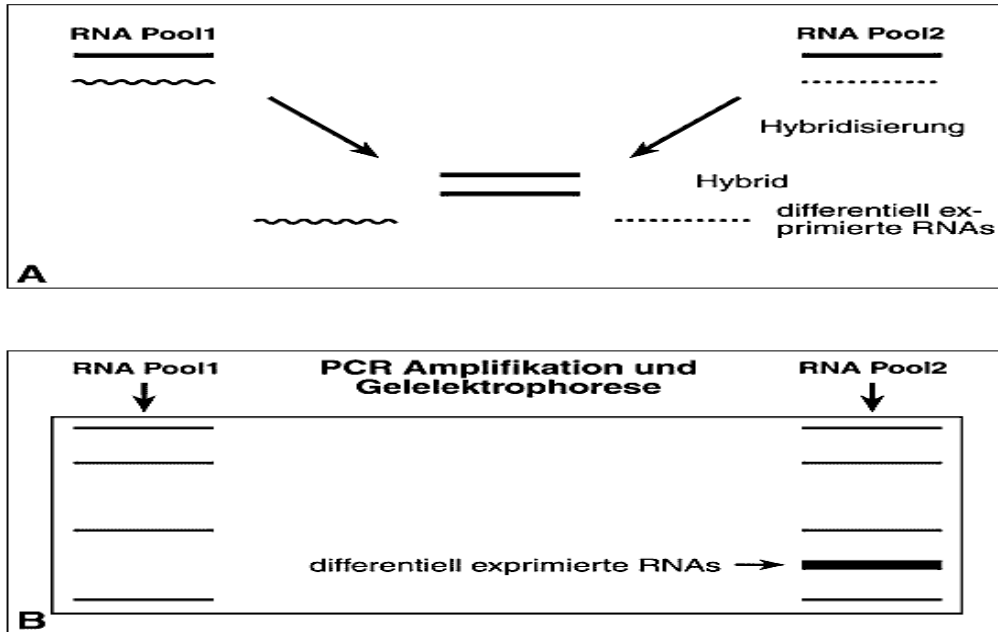
### **1.3 Methoden um differentiell exprimierte Gene zu studieren**

Mit der Fähigkeit vollständige Genome zu sequenzieren, richtet sich das Interesse der Wissenschaft nicht mehr nur auf die Produktion von DNA-Sequenzen. Die Definition der Funktionen der Gene im gesamten Genom ist die neue Herausforderung. Ein Schaltplan des Zusammenwirkens aller Gene, und ihrer Produkte im Organismus, soll die Lebensprozesse verständlichen. Da die Genexpressionsanalyse ein wichtiges Werkzeug für die Genomforschung darstellt, wurden viele verschiedene Verfahren entwickelt. Diese reichen vom schon längerer Zeit bekannten Northern Blotting bis zum heute sehr oft eingesetzten Microarrayverfahren.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit Hilfe der Subtraktionshybridisierung, Gene zu identifizieren, die bei Infektionsabwehr von *Malus domestica cv Florina* mit *Venturia inaequalis* differentiell exprimiert sind.

#### **1.3.1 Differential Display**

Der Methode des Differential Display liegt die Idee zugrunde, die RNA-Profile mehrerer Zellpopulationen mittels Gelelektrophorese miteinander zu vergleichen. Dabei wird zuerst die gesamte RNA der zu untersuchenden Zellen in cDNA umgeschrieben. In einer abschließenden PCR werden durch den Einsatz bestimmter Primerkombinationen jeweils Anteile der Gesamtheit der cDNA-Moleküle amplifiziert. Diese amplifizierten Anteile werden auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und sind aufgrund einer gegenüber der Gesamt-RNA herabgesetzten Komplexität analysierbar. Falls zwischen den zu vergleichenden Zellpopulationen Unterschiede in der Expression bestimmter RNA-Moleküle auftreten, sollten sich diese Unterschiede auch in zumindest einem der amplifizierten Anteile der cDNA-Moleküle wieder finden (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Differential Displays (Leslie et al., 1992)

### 1.3.2 RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR)

RAP-PCR dient dazu, einen repräsentativen Querschnitt durch die, von den untersuchten Zellen exprimierte mRNAs, zu erhalten. Der Vergleich mit Kontrollgruppen ermöglicht so die Identifizierung zellspezifisch hoch- oder herunterregulierter Gene. Um dieses Ziel zu erreichen, überschreibt man zunächst die isolierte RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase und eines ersten arbiträren Primers in cDNA. In einem PCR-Schritt mit einem zweiten arbiträren Primer wird dann der sog. Fingerprint erzeugt. Arbiträre Primer sind kurze Oligonukleotide (10 – 15 Basen lang), die unter den gewählten, wenig stringenten Bedingungen, innerhalb wenigen hundert Basenpaaren an den einen oder den anderen Strang der cDNA binden. Eine weniger perfekte Bindung an einer Seite kann durch eine sehr gute Übereinstimmung auf der anderen Seite des Primers kompensiert werden (McClelland et al., 1995). Von Bedeutung ist hier zum einen, dass die so erzeugten PCR-Produkte unter den gleichen Bedingungen wieder erzeugt werden können. Der Fingerprint ist also reproduzierbar. Weiterhin korreliert das Verhältnis der Intensitäten zweier Banden mit der Konzentration der zugrunde liegenden mRNA, der Fingerprint spiegelt somit auch die Häufigkeit einzelner mRNAs wieder (Tortola *et al.*, 1998; Welsh *et al.*, 1992). Ein entscheidender Vorteil ist weiterhin die Tendenz zur bevorzugten Vervielfältigung seltener mRNAs, (Mathieu-Daude *et al.*, 1996; McClelland *et al.*, 1995), was das Auffinden mit anderen Methoden bisher nicht erkannten Unterschiede ermöglicht.

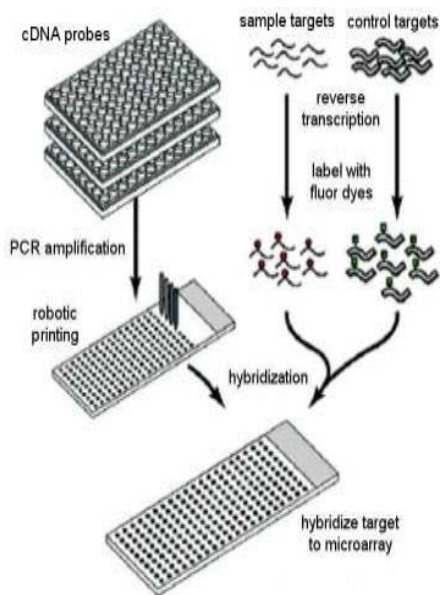
### 1.3.3 Microarray

Das Grundprinzip von Microarrays ist die Hybridisierung von zwei komplementären einzelsträngigen Nukleinsäuresequenzen aneinander. Ist die genaue Sequenz eines Stranges bekannt, so kennt man im Falle einer Bindung auch die Sequenz des

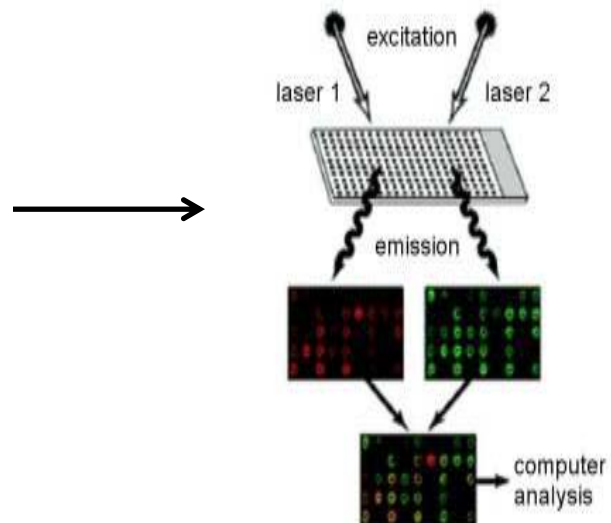
gebundenen Nukleotidstranges. Zuerst werden zwei zu untersuchende Proben von mRNA, z.B. aus einem gesunden Gewebe, zur Kontrolle (control targets) und einem kranken Gewebe (sample targets), in cDNA umgewandelt.

Die beiden cDNA-Proben werden dann unterschiedlich markiert, damit sie später unterschieden werden können. Anschliessend werden die cDNA targets gegen die cDNA probes auf den Arrays hybridisiert (Abbildung 2).

Nach der Hybridisierung werden die losen cDNA targets vom Chip abgewaschen und die, von den gebundenen cDNA targets ausgehenden Signale, detektiert. Die fluorisierenden Farbstoffe auf Glasplattenarrays werden mit zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge sichtbar gemacht. Dieser Prozess erzeugt ein Bild mit unterschiedlichen Farb- und Helligkeitsintensitäten für jeden Fixierungspunkt (spot) des Arrays, wobei die Intensitäten von der Anzahl gebundener cDNA targets an den komplementären cDNA probes abhängig sind: Die Farb- und Helligkeitsintensität aller Spots, deren Anzahl in der Größenordnung von einigen 100.000 liegt, bilden die erzeugte Datenmenge. Diese Intensitäten werden gemessen und korrigiert, bevor die Expressionsstärke jedes einzelnen Gens als Zahl ausgedrückt, durch Bildverarbeitungssoftware ermittelt wird (Abbildung 3).



**Abbildung 2:** Hybridisierungsphase  
(Shoemaker et al, 2001)



**Abbildung 3:** Visualisierungsphase

### 1.3.4 Suppressive Subtraktive Hybridisation (SSH)

Differentielle Genexpression hat einen wichtigen Einfluss beim Zellwachstum, bei Differenzierungsvorgängen und pathophysiologischen Bedingungen. Um jene Gene zu identifizieren, welche bei einer Infektion von Apfelbäumen durch *Venturia inaequalis* involviert sind, wurde ein PCR basierende, cDNA subtraktive Strategie angewandt, die sogenannte Suppression Subtraktive Hybridisation, (Lau et al., 1996).

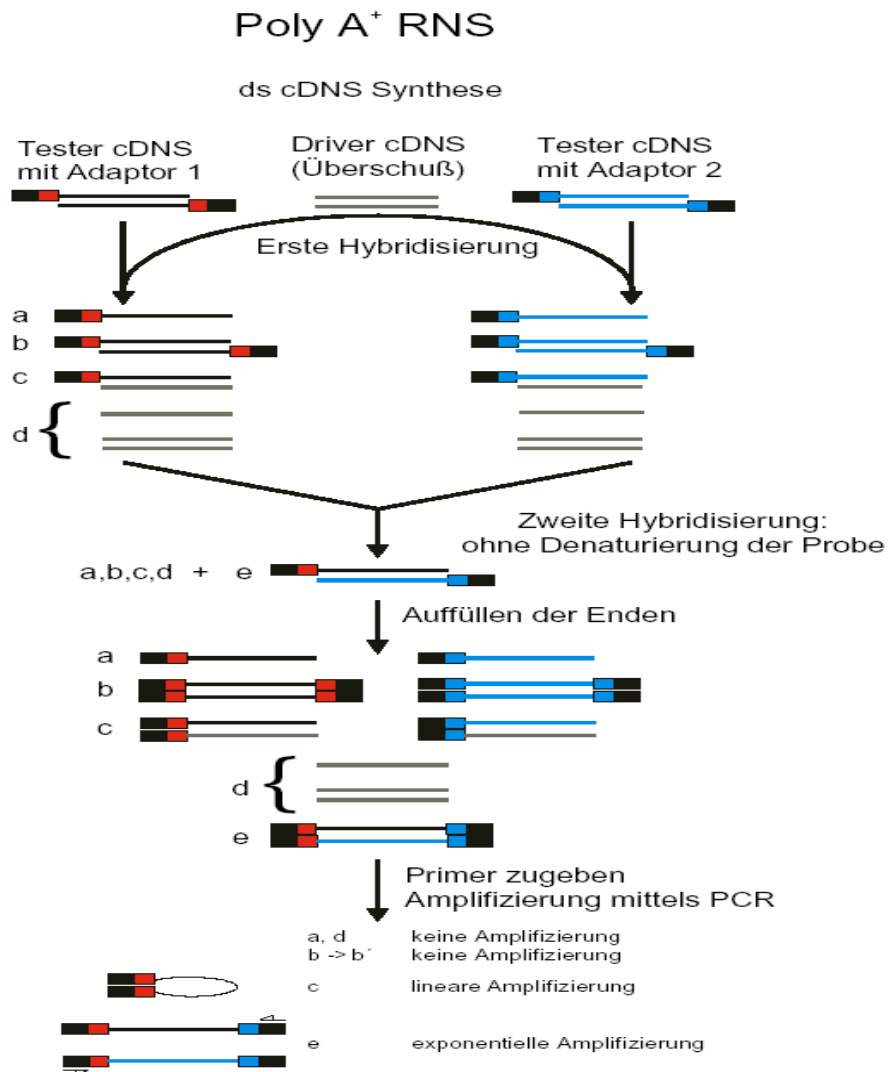
SSH wird verwendet um selektiv differentiell exprimierte cDNA Fragmente bei gleichzeitiger Unterdrückung andere DNA Arten zu delektieren.

Obwohl es mehrere subtraktive Hybridisations-Techniken gibt, ist die Basistheorie hinter der Subtraktion einfach. Zuerst werden die zwei zu vergleichenden RNA-Populationen in cDNA umgeschrieben. Die cDNA, welche die spezifischen (differentiell) exprimierte Transkripte enthält, wird als „Tester“ und die Kontroll-cDNA als „Driver“ bezeichnet. Tester- und Driver -cDNA werden hybridisiert. Die Hybridisationsprodukte werden entfernt. Konsequenterweise sind die noch vorhandenen unhybridisierten cDNA-Fragmente jene Gene, welche nur im Tester exprimiert werden.

### **1.3.5 Die molekulare Basis von PCR-Select cDNA Subtraktion**

Als Ausgangsmaterial werden mRNA der zu vergleichenden Zellen oder Gewebe benötigt. Diese werden in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Nach der Fragmentierung beider cDNA-Populationen durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym Rsa I, das eine 4- bp- Erkennungssequenz besitzt, wird jeweils die Hälfte der "Tester- cDNS“-Fragmente beidseitig mit den Adaptoren 1 oder 2 versehen (Abbildung 5). In einer ersten Hybridisierungsreaktion wird in zwei getrennten Ansätzen jeweils die "Tester-cDNS" mit einem hohen Überschuss von

"Driver-cDNA" hybridisiert. Als Ergebnis können die Moleküle vom Typ a, b, c oder d entstehen. Da die Hybridisierungsreaktion einer Kinetik zweiter Ordnung folgt, findet eine Normalisierung zwischen den differentiell exprimierten cDNA-Fragmenten statt, die in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen, da die redundanten cDNA-Fragmente präferentiell Moleküle vom Typ b bilden. Gleichzeitig werden die Typ-a-Moleküle signifikant angereichert. In einer zweiten Hybridisierungsreaktion werden die Produkte der ersten Reaktion ohne vorherige Denaturierung vermischt. Es kommt zur Ausbildung der Hybridmoleküle vom Typ -e, die vorwiegend differentiell exprimierte cDNA-Fragmente beinhalten. Durch eine PCR mit Primern, die spezifisch an die beiden Adaptoren binden, können nur die Typ-e Moleküle exponentiell amplifiziert werden, da eine Amplifikation der Typ-b Moleküle durch intramolekulare Hybridisierung stark herabgesetzt ist. Die so angereicherten differentiell exprimierten Genfragmente können subkloniert und identifiziert werden.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der PCR-Select Technik (CLONTECH).

## 1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist diejenigen Gene zu identifizieren, welche bei der Pflanzen-Pathogen Interaktion zwischen der schorrfresistenten Apfelsorte Florina und dem Pathogen *Venturia inaequalis*, differentiell exprimiert werden. Dabei sollten erste Erkenntnisse gewonnen werden, welche Abwehrmechanismen bei dem *Vf*-Gen (*Venturia-floribunda*) vermittelten Resistenz in der Apfelsorte Florina beteiligt sind. Die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene soll mit der oben beschriebenen PCR-Select cDNA Subtraktionsmethode und nachfolgender Datenbank-Vergleich mit bekannten DNA-Sequenzen erreicht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Gewinnung der Konidien von *Venturia inaequalis*

Blätter von der Sorte *Golden Delicious*, die durch *Venturia inaequalis* befallen waren, wurden in ein 50 ml Falcon-Tube gegeben und mit 25 ml Wasser vermischt. Das Röhrchen wurde ca. 10 Minuten kräftig geschüttelt um die Konidien darin in die flüssige Phase zu überführen. Die Konidien suspension wurde mit Hilfe einer Gaze, wie sie in der Käseverarbeitung verwendet wird, filtriert und in ein neues 50 ml Falcon-Tube übertragen. Das Tube wurde dann bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Wasser resuspendiert. 10 µl der Suspension wurden auf eine Toma-Kammer aufgetragen und unter dem Mikroskop die Konidienzahl auf den 4 x 16 Quadraten der Toma-Kammer bestimmt. Die Gesamtzahl der gefundenen Konidien, multipliziert mit 100, ergibt die Konidienkonzentration pro ml. Die Konidien suspension wurde dann auf die optimale Konidien dichte von 20'000 pro ml verdünnt.

### 2.2 Infektion von Florina Apfelbäumen mit *Venturia inaequalis*

Die Konidien suspension wurde mit einem Handsprühergerät auf die 3 jüngsten Blätter pro Apfelbaum aufgetragen. Die Blätter der 5 Kontrollpflanzen („Driver“) wurden nach dem Besprühen mit der Konidien suspension, sofort mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C zwischengelagert.

Die 5 Testpflanzen („Tester“) wurden in einer 18°C-Klimakammer, im Dunkeln, unter ein Plastikzelt gestellt. Der Boden des Zeltes wurde mit ca. 30°C warmen Wasser aufgefüllt, um innerhalb des Zeltes eine 100%-ige Luftfeuchtigkeit zu erhalten. Nach 48 Stunden wurden dann die infizierten Blätter der 5 Testpflanzen ebenfalls mit flüssigem N<sub>2</sub> tiefgefroren.

### 2.3 Isolierung von RNA aus Apfelblätter

Die RNA-Isolierung wurde gemäß Protokoll aus Krieg et al., 1996 gemacht. Dabei wurde die „Hot-Borate-Methode“ angewandt, welche optimiert wurde, um einen hohen Ertrag und eine Reinheit der RNA, auch aus Geweben mit einer hohen Konzentration von sekundären Stoffwechselprodukten, wie Polysaccharide, zu gewinnen (Wan und Wilkins, 1994).

## Lösungen

- **0.1% DEPC** (Diethylpyrocarbonat) behandeltes Bidestwasser
  - Unter der Abzugshaube wurden in 2 Einliterflaschen je 800 ml Bidestwasser, mit 800 µl DEPC gemischt.
  - Mischung kräftig schütteln und über Nacht unter der Abzugshaube stehen lassen.
  - Autoklavieren.

- Nach dem Autoklavieren Flaschen nochmals unter der Abzugshaube öffnen, um das verbleibende CO<sub>2</sub> zu entlassen, damit es nicht zur Bildung von Karbonsäure kommt.

- **Minimum XT-Buffer 250 ml**

<b>1% SDS</b> (Natriumdodecylsulfat)		2,50 g
<b>1% Deoxycholic acid, sodium salt,</b>		2,50 g
<b>5 mM EDTA</b> (Ethylendiamine-tetraacetic acid)		2,79 g
<b>0,2 M Na borate decahydrate</b> (Borax)		19,07 g
<b>10 mM DTT</b> <sup>1)</sup> (Dithiothreitol)	in 20 ml DECP-H <sub>2</sub> O	30,86 mg
<b>20% PVP-30</b> <sup>2)</sup> (Polyvinylpyrrolidone),	in 20 ml DECP-H <sub>2</sub> O	4,00 g
<b>20mg/ml Proteinase K</b> <sup>1)</sup>	in 2,5 ml DECP-H <sub>2</sub> O	50,00 mg
<b>1% NP-40</b> (Nonidet P-40)	flüssig	2,5 ml
<b>10 mM Tris-HCL</b> <sup>3)</sup> pH 7,5*	in 200 ml DECP-H <sub>2</sub> O	0,24 g
<b>2 M Kaliumchlorid</b> <sup>3)</sup>	in 200 ml DECP-H <sub>2</sub> O	29,80 g
<b>2 M Kaliumacetat</b> <sup>3)</sup> pH 5,5*	in 200 ml DECP-H <sub>2</sub> O	39,20 g
<b>8 M LiCl</b> <sup>3)</sup>	in 200 ml DECP-H <sub>2</sub> O	67,80 g
<b>3 M Na-acetat</b> <sup>3)</sup> , pH 6*	in 200 ml DECP-H <sub>2</sub> O	81,65 g

<sup>1)</sup>bei -20°C eingefrieren

<sup>2)</sup> vor Licht schützen

<sup>3)</sup>autoklaviere die Lösungen

\*pH mit 2 M NaOH oder 37% Salzsäure adjustiert.

### Vorgehen:

Die Blätter der Kontroll- und Testbäume wurden gewogen und so schnell als möglich wieder mit flüssigem N<sub>2</sub> gekühlt, um einer RNase-Aktivität vorzubeugen. Das optimale Blattgewicht liegt bei 5 g. Bei entsprechender Anpassung der verwendeten Reagenzien können auch weniger als 5 g verwendet werden.

Kurz vor der Zerkleinerung der Apfelblätter wurde der XT-Buffer wie folgt fertig gestellt:

- „**minimum XT-buffer**“ 3,5ml/g Blätter
  - **PVP** 2% vom Volumen des minimum XT-Buffer
  - **DTT** 1% vom Volumen des minimum XT-Buffer
  - **NP-40** 1% vom Volumen des minimum XT-Buffer
- XT-Buffer in einem 80-90°C Wasserbad equilibrieren lassen.
  - Die Blätter in einem autoklavierten und bei -80°C vorgekühlten Porzellan-Mörser geben und zu einem feinen P oder zerkleinern. Durch die ständige Zugabe von flüssigem Stickstoff die Blätter immer tiefgekühlt halten.

- Blätter in ein 50 ml Tube transferiert und sofort heisser XT-Buffer und 110ul pro Gramm Blattmasse Protenase K (20mg/ml) zugeben.
- Das Tube für 1,5 Stunden in ein 42°C heisses Wasserbad stellen und alle 10 Minuten vortexen.
- Gebe 280 µl 2 M KCl pro Gramm Blattmasse bei, dies sollte einer Endkonzentration von 160mM KCl entsprechen. Vermische es durch leichtes schütteln.
- Tubes bei einer Temperatur von 4°C bei 6800 rmp<sup>1)</sup> für 20 Minuten zentrifugieren.
- Überführe den Überstand in ein neues 50 ml-Tube.
- Gebe 1/3 Volumen der Suspension, 8 M LiCl, bei, dies sollte einer Endkonzentration von 2 M LiCl entsprechen.
- Inkubiere die Suspension über Nacht bei 4°C.
- Zentrifugiere bei einer Temperatur von 4°C bei 6800 rmp<sup>1)</sup> für 20 Minuten.
- Verwerfe Überstand.
- Wasche das Pellet in 4 ml kalten (4°C) 2M LiCl. Löse das Pellet durch leichtes Schütteln auf.
- Zentrifugiere bei einer Temperatur von 4°C bei 6800 rmp<sup>1)</sup> für 10 Minuten.
- Verwerfe Überstand.
- Wiederhole den Wasch-Schritt weitere 2 Mal. Nach dreimaligen Mal waschen sollte der Überstand relativ farblos sein. Ist dies nicht der Fall wasche das Pellet ein weiteres Mal.
- Suspensiere Pellet in 2 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) durch leichtes vortexen.
- Zentrifugiere bei einer Temperatur von 4°C bei 6800 rmp<sup>1)</sup> für 10 Minuten.
- Überführe den Überstand in ein neues 15 ml Falocn-Tube.
- Gebe 1/10 Volumen 2 M Kaliumacetat (pH 5,5) bei.
- Inkubiere die Suspension im Eis für 15 Minuten.
- Zentrifugiere bei einer Temperatur von 4°C bei 6500 rmp<sup>1)</sup> für 10 Minuten.
- Überführe den Überstand in ein autoklaviertes Corex-Röhrchen.
- Gebe 2,5 X Volumen 100% Ethanol bei. Präzipitiere RNA über Nacht bei 20°C oder für 2 Stunden bei -80°C.
- Zentrifugiere bei einer Temperatur von 4°C bei 9000 rmp<sup>1)</sup> für 30 Minuten.
- Überstand verwerfen.
- Pellet mit 70% Ethanol waschen.
- Zentrifugiere bei einer Temperatur von 4°C bei 9000 rmp<sup>1)</sup> für 5 Minuten.
- Entferne Ethanol.
- Resuspendiere Pellet in 200-300 µl DEPC behandeltes Bidestwasser.

<sup>1)</sup>Sorvall RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge, DuPont Instruments  
Sorvall SS-34 Rotor.





## 2.4 Isolierung von PolyA<sup>+</sup> RNA

Für die Isolierung von PolyA<sup>+</sup> RNA wurde der FastTrack® 2.0 Kit der Firma Invitrogen verwendet. In folgenden Schritten wurde das Protokoll modifiziert:

- “Washing Oligo(dT) Cellulose”: Die Oligo(dT) Cellulose wurde in 500 µl Low Salt Wash Buffer resuspendiert ( Nr. 4, Seite 11).
- “Elution and Precipitation of the mRNA“: Das Zellulose-Bett wurde insgesamt fünf Mal mit Elution-Buffer gewaschen und für je 1 Minute zentrifugiert. Für jede Elution wurde ein neues Eppendorf-Tube verwenden (Punkt 4, Seite 12).
- ”Elution and Precipitation of the mRNA“: Das RNA-Pellet wurde in DEPC-Wasser resuspendiert.
- “Determination of RNA Yield”: Für jedes Eppendorf wurde die Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

## 2.5 Subtraktive Hybridisation

**Die Subtraktive Hybridisation wurde mit Hilfe des Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit der Firma BD Biosciences durchgeführt.**

Das Protokoll wurde in den Abschnitten IV und V wie folgt abgeändert:

### IV Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Protocols

- E. Rsa I Digestion: Die Proben wurden im 37°C Wasserbad für 1,5 Stunden inkubiert (Nr. 3, Seite 16).
- F. Adaptor Ligation: Es wurde keine Kontroll -Subtraktion mit Muskelzellen -RNA durchgeführt (Nr. 2, Seite 19).
- G. First Hybridization: Es wurde kein Mineralöl verwendet (Nr. 2, Seite 21).
- I. PCR Amplification: Herstellung des primären PCR Master-Mix (Nr2, Seite 24).

Reagenz	Menge in µl	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O	18.1	
10X PCR Reaction buffer <sup>a)</sup>	2,5	
MgCl <sub>2</sub> (30mM) <sup>a)</sup>	1.5	1.9 mM
dNTP Mix (10 mM) <sup>a)</sup>	0.5	0.2 mM
PCR Primer 1 (10µM) <sup>a)</sup>	1.0	0.4 µM
BioXact (4 U/µl) <sup>b)</sup>	0.4	0.07 U
Endvolumen	24.0	

<sup>a)</sup> BD Biosciences, USA, im Kit enthalten

<sup>b)</sup> Bioline, USA

- I. PCR Amplification: Das PCR wurde mit dem PCR Systems 9600 von Perkin-Elmer Gene Amp, wie folgt durchgeführt (Schritt 7, Seite 24):

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94°C	15 Sek.
40	94°C	10 Sek.
	60°C	30 Sek.
	71°C	3 Min.

- I. PCR Amplification: Es wurde je 5 µl DNA auf das Gel überprüft (Nr. 8, Seite 24).

- I. PCR Amplification: Sekundärer PCR-Master-Mix (Nr. 11, Seite 25):

Reagenz	Menge in µl	Endkonzentration
MgCl <sub>2</sub> (30mM) <sup>a)</sup>	1,5	1.87 mM
ddH <sub>2</sub> O	17.0	
10X PCR Reaction buffer <sup>a)</sup>	2,5	
Nested PCR primer 1 (10 µM) <sup>a)</sup>	1.0	0.42 µM
Nested PCR primer 2R (10 µM) <sup>a)</sup>	1.0	0.42 µM
dNTP Mix (10 mM) <sup>a)</sup>	0.5	0.21 mM
BioXact (4U/µl) <sup>b)</sup>	0.5	0.08 U
Endvolumen	24.0	

<sup>a)</sup> BD Biosciences, USA, im Kit enthalten

<sup>b)</sup> Bioline, USA

- I. PCR Amplification: Das PCR wurde mit dem PCR Systems 9600 von Perkin-Elmer Gene Amp, wie folgt durchgeführt (Nr. 25, Seite 25):

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
25	94°C	10 Sek.
	62°C	30 Sek.
	71°C	3 Min.

## V . Analysis of Results and Troubleshooting Guide

- C. Analysis of Ligation: Kombiniere die Reagenzien für die Forward beziehungsweise für die Revers Reaktion, wie folgt (Nr. 2, Seite 29):

### Forward /Revers Reaktion

Komponenten	Tube: 1	2	3	4
Tester 1-1	1µl	1µl	-	-
Tester 1-2	-	-	1µl	1µl
Rubisco-Primer3 <sup>a)</sup> (10µM)	1µl	1µl	1µl	1µl
Rubisco-Primer 5 <sup>a)</sup> (10µM)	-	1µl	-	1µl
PCR Primer 1 (10µM) <sup>b)</sup>	1µl	-	1µl	-
Total Volumen	3µl	3µl	3µl	3µl

<sup>a)</sup> von C. Toller zur Verfügung gestellt, unveröffentlicht

<sup>b)</sup> BD Biosciences, USA, im Kit enthalten

- C. Analysis of Ligation:, Ligation Analyse PCR Master-Mix (Nr 3, Seite 29):

Reagenz	Menge in µl	Endkonzentration
ddH2O	18,5	
10X PCR reaction buffer <sup>a)</sup>	2,5	
dNTP Mix (10mM) <sup>a)</sup>	0,5	0.23 mM
BioXact (4U/µl) <sup>b)</sup>	0.5	0.09 U
Total Volumen	22.0	

<sup>a)</sup> BD Biosciences, USA, im Kit enthalten

<sup>b)</sup> Biotline, USA

- C. Analysis of Ligation: Es wurde kein Mineralöl verwendet (Nr. 7, Seite 30)
- C. Analysis of Ligation: Es wurde mit dem PCR-System 9600 der Firma Perkin-Elmer GeneAmp gearbeitet (Nr. 9, Seite 30)
- E. PCR Analysis of Subtraction Efficiency: Dieser Teil wurde nicht durchgeführt.

## 2.6 Klonierung

Medien:            500 ml LB-Medium:

5.0 g Trypton  
2.5 g Yeast extract  
5.0 g NaCl

- in 400 ml H<sub>2</sub>O lösen
- pH 7 mit 2 M NaOH einstellen
- auf 500 ml auffüllen

50 µg/ml Kanamycin LB-Platten

500 ml LB-Medium  
7.5 g Agarose

- autoklavieren
- abkühlen auf ca. 50°C und

50 µl Kanamycin (50µl/ml) zugeben

Die Klonierung erfolgte mit dem Topo XL PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen gemäss Herstellerangaben. Es wurde chemisch kompetente *E. coli* verwendet.

## 2.7 Propagation und PCR

Die Hälfte einer Kolonie wurde mit einer 10 µl Pipetten-Spitze in ein Masterplatte gegeben welche pro Kammer 1 ml LB-Medium enthält. Die Masterplatten werden über Nacht bei 37°C auf einen Schüttler gestellt. Am nächsten Morgen werden dem Masterplatte je Kammer 1 ml 87%-iges Glycerol zugegeben und bei -80°C eingefroren. Die andere Hälfte der Kolonie wurde ebenfalls mit einer 10 µl Pipetten-Spitze in ein PCR-Ansatz gegeben.

PCR Master-Mix:

Reagenz	Menge in µl	Endkonzentration
MgCl <sub>2</sub> <sup>a)</sup>	1,0 µl	
Steriles H <sub>2</sub> O	18.9 µl	
10X PCR Reaction Buffer <sup>a)</sup>	2.5 µl	
Nested PCR Primer 1 <sup>b)</sup> (10µM)	1,0 µl	0.40 µM
Nested PCR Primer 2 <sup>b)</sup> (10µM)	1.0 µl	0.40 µM
dNTP Mix <sup>a)</sup> (10mM)	0.5 µl	0.20 mM

Taq Polymerase <sup>a)</sup> (5 U/μl)	0.1 μl	0.02 U
Total Volumen	25.0 μl	

<sup>a)</sup> Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA

<sup>b)</sup> BD Biosciences, USA, im Kit enthalten

### PCR Programm:

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
1	96°C	10 Min.
30	94°C	10 Sek.
	62°C	30 Sek.
	71°C	3 Min.
	4°C	∞
1	4°C	∞

## **2.8 Analyse der PCR Produkte und Southern Blot**

Jeder PCR-Ansatz wurde auf zwei 1% TAE-Agarosegelen aufgetragen, dabei wurden je 12,5 μl DNA und 4 μl Bluejuice geladen.

Die Southern Blots wurden gemäss Sambrook et al. (2001), durchgeführt.

### Medien:

#### Transfer-Buffer (20X SSC)

3.0 M NaCl

3.0 M Tri Sodium Citrat

- pH 7 adjustieren mit 2 M NaOH
- autoklavieren

#### Denaturations-Buffer

0.5 M NaOH

1.5 M NaCl

#### Neutralisations-Buffer

1.0 M Tris-HCL

1.5 NaCl

### **Vorgehen:**

Gel für 30 Minuten in Denaturations-Buffer und 15 Minuten in Neutralisations-Buffer, auf einem Schüttler, inkubieren. Nach der Inkubation Gel mit 2X SSC

waschen. Das „Blotting“ wurde auf einer Hybond™-N+ Nylonmembrane (Amersham Pharmacia) durchgeführt.

Nach dem „Blotting“ wurde die Membrane für 1 Stunde im Ofen bei 80-90°C getrocknet und dann beide Seiten der Membrane für 1 Minute mit UV-Licht bestrahlt.

## 2.9 Herstellung der Hybridisierungssonden und Hybridisierung

Die mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurden mit dem HotScribe First-Stand cDNA Labelling Kit, der Firma Amersham-Pharmacia, laut Herstellerangaben durchgeführt. Im Schritt 6 des Protokolls wurde HEPES Free Acid (Calbiochem) verwendet.

Die Vorhybridisierung erfolgte in 2x SSC und 100µg/ml denaturierter Lachs-Spermien-DNA, über Nacht, bei 65°C, in einem Rollerofen (HB-1000 Hybridizer, der Firma UVP). Die Hybridisierung wurde daraufhin bei gleicher Temperatur, über Nacht, durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurde die Membran aufeinander- folgend, zwei Mal mit 0,5x SSC / 0,1% SDS, für je 30 Minuten und je einmal mit 0,1x SSC / 0,1% SDS, für 30 Minuten, beziehungsweise 1,5 Stunden, bei Hybridisierungs-temperatur gewaschen. Abschließend wurde die Membran in Plastikfolie (Saran) verpackt und auf einem Röntgenfilm, (Kodak Biomax MR) bei -80°C exponiert. Mit Hilfe des Filmentwicklers „Curix60“ (AGFA) wurde, je nach Intensität des radioaktiven Signals, die Filme nach 1-3 Tagen entwickelt.

## 2.10 PCR und PCR-Reinigung

Die durch die Southern-Blot-Analyse gefundenen, differentiell exprimierten Gene, wurden wie folgt amplifiziert:

Von den bei -80°C eingefroren Masterplates wurde mit Hilfe einer 10µl-Pipettenspitze einen Abstrich der entsprechenden Klone, auf eine 50 µg/ml Kanamycin LB-Platten, gemacht. Die Platten wurden über Nacht, bei 37°C, inkubiert und pro Klone eine Kolonie, mit einer Pipetten-Spitze, in folgenden PCR-Ansatz gegeben:

### PCR Master-Mix:

Reagenz	Menge in µl	Endkonzentration
Steriles H <sub>2</sub> O	15.9 µl	
10X PCR Reaction Buffer <sup>a)</sup>	2.0 µl	
M13 forward PCR Primer (10µM) <sup>b)</sup>	0.4 µl	0.2 µM
M13 reverse PCR Primer (10µM) <sup>c)</sup>	0.4 µl	0.2 µM
dNTP Mix (10mM)	1.0 µl	0.5 mM

Taq Polymerase (5 U/μl) <sup>a)</sup>	0.3 μl	0.015 U
Total Volumen	20.0 μl	

<sup>a)</sup> Amersham Pharmacia Biotech, Inc., USA

<sup>b)</sup>M13 forward Primer: 5' GTAAAACGACGGC 3'

<sup>b)</sup>M13 reverse Primer: 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

### PCR Programm:

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
1	96°C	10 Min.
30	94°C	10 Sek.
	62°C	30 Sek.
	71°C	3 Min.
1	4°C	∞

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit einer „MultiScreen™ PCR-Plate (Millipore) wie folgt gereinigt:

Der Platte wurde pro Kammer 30 μl steriles H<sub>2</sub>O und das PCR-Produkt beigegeben. Unter Vakuum wurde die Flüssigkeit abgesaugt, wobei die DNA in der Filtermembrane hängen bleibt und nur dNTP's und Primer durch die Membrane gelangen. Zum Waschen der DNA wurden weitere 30 μl steriles H<sub>2</sub>O den Kammern beigegeben und ebenfalls unter Vakuum abgesogen. Um die DNA wieder von der Membrane zu lösen, wurden 20 μl steriles H<sub>2</sub>O beigegeben und ca. 10 Minuten auf einen Schüttler gestellt.

Von den gereinigten PCR-Produkten wurden je 2μl auf ein 1% TAE-Gel aufgetragen und mit Hilfe von Konzentrationsstandarten (5ng, 10ng 25ng) die DNA- Konzentration der PCR-Produkte bestimmt.

### **2.11 Sequenzierung**

Nachdem die cDNA-Fragmente durch ein „Kolonie-PCR amplifizierten und gereinigt worden waren, wurde mit ihnen ein „Cycle Sequence-Reaktion“ wie folgt durchgeführt:

Reagenz	Menge in μl	Endkonzentration
Steriles H <sub>2</sub> O	X μl	
5X rxn Buffer <sup>a)</sup>	1.5 μl	
M13 forward PCR Primer <sup>b)</sup> (1.6μM)	0.4 μl	0.032μM
Big Dye <sup>a)</sup>	1.0 μl	



DNA (10-12 ng)	Y $\mu$ l
Total Volumen	20.0 $\mu$ l

a) Applied Biosystems.

b) M13 forward Primer: 5' GTAAAACGACGGC 3'

#### Cycle-Sequence-Reaktion:

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
35	96°C	10 Sek.
	50°C	5 Sek.
	60°C	4 Min.
1	4°C	$\infty$

Die Sequenzierung wurde auf dem Sequenzor "3100 Genetic Analyzer" (Appliedbiosystem), durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Datenbank auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>, mit der Funktion „Translated BLAST Searches; Nucleotide query - Protein db“, verglichen.

Die Überprüfung, ob es sich bei den gefundenen Sequenzen um das gleiche Gen handelte, wurde mit dem Programm Clustalw ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) gemacht.

## 2.12 RNA Gelelektrophorese und Northern Blotting

Medien:

5X Mops  
0.2 M Mops  
50 mM Na-Acetat  
10 mM EDTA, pH 8,0

- pH 7 adjustieren
- autoklavieren

Laufbuffer (750 ml)  
5X Mops 150 ml  
37% Formaldehyde 60 ml  
destiliertes H<sub>2</sub>O 540 ml

Ladebuffer (200  $\mu$ l)  
Formamid 100  $\mu$ l  
37% Formaldehyde 40  $\mu$ l  
400 $\mu$ g/ml Ethydiombromid 8  $\mu$ l  
5X Mops 10  $\mu$ l  
destiliertes H<sub>2</sub>O 42  $\mu$ l

85 ml Gel: 1.2 % Agarose 1.05 g  
destiliertes H<sub>2</sub>O 65.10 ml

- in der Mikrowelle erhitzt
  - auf ca. 60°C abkühlen
- |                  |         |
|------------------|---------|
| 5X Mops          | 21.0 ml |
| 37% Formaldehyde | 18.9 ml |

Vor Versuchsbeginn wurden alle für die Gelelektrophorese verwendeten Teile wie Gelkammer, Träger und Kamm mit „RNase AWAY“, (Invitrogen), gewaschen und sorgfältig mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Während das Gel 30 Minuten unter der Abzugshaube aushärtete, wurden die zu untersuchenden RNA-Proben für 2 Minuten bei 65°C im Wasserbad denaturiert und dann für 2 Minuten in Eis gestellt. Pro RNA-Sample wurden 3µg mRNA sowie 15 µl Ladebuffer und 3 µl Bluejuice in einem Eppendorf-Tube gemischt und auf das Gel aufgetragen.

**Das nachfolgende „Northern Blotting“ erfolgte wie bei dem „Southern Blotting, ausser, dass beim Laufbuffer 10X SSC, anstelle von 20X SSC, verwendet wurde.**

### 2.13 Herstellung der Hybridisierungssonden und Hybridisierung

Die mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurden mit dem Nick Translation System Kit (Invitrogen), nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Vorhybridisierung erfolgte mit 2x Denhardt's Reagenz in 6x SSC/0,1% SDS für 6 Stunden bei 65°C in einem Rollerofen (HB-1000 Hybridizer, der Firma UVP).

Die Hybridisierung wurde daraufhin bei gleicher Temperatur über Nacht durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurde die Membran aufeinander- folgend ein Mal mit 2x SSC / 0,1% SDS für 15 Minuten und drei Mal mit 0,1x SSC / 0,1% SDS für 15 Minuten, bei Hybridisierungs-Temperatur, gewaschen. Abschließend wurde die Membran in Plastikfolie (Saran) verpackt und auf einem Röntgenfilm, (Kodak Biomax MR) bei -80°C exponiert. Mit Hilfe des Filmentwicklers „Curix60“ (AGFA) wurde je nach Intensität des radioaktiven Signals, die Filme nach 1-3 Tagen, entwickelt.

### 3. Resultate

#### 3.1 Gesamt-RNA Extraktion

Von den 5 *Florina* Apfelbäumen, die als Kontrolle dienten, wurden insgesamt 3.2 g Blätter und bei der 48-Stunden-Inokulierten, 5.0 g Blätter für die RNA-Extraktion verwendet.

Die durch die „Hot-Borate-Methode“ isolierten Gesamt-RNA wurde mit einem Photospektrometer auf ihre Reinheit und ihre Konzentration überprüft. Die Kontroll-RNA wurde 1:150 und die der 48-Stunden-Inokulierte RNA, 1:300 verdünnt. Der Verdünnungsfaktor musste so hoch angesetzt werden, da nur eine 1 ml Quarzküvette vorhanden war und nur 300 µl Gesamt-RNA pro Sample zur Verfügung standen (Tabelle 1).

	260 nm	280 nm	Ratio	Konz. (µl /ml)	Verdün.-Faktor	Vol (ml)	Total (mg)
<b>Kontrolle</b>	2.56	1.37	1.88	100.2	1 : 300	1	<b>4.5</b>
<b>48h</b>	2.5	1.4	1.85	100.15	1 : 150	1	<b>8.8</b>

**Tabelle 1:** Photospektrometrische Messdaten der Gesamt-RNA Extraktion.

#### 3.2 Isolierung der mRNA

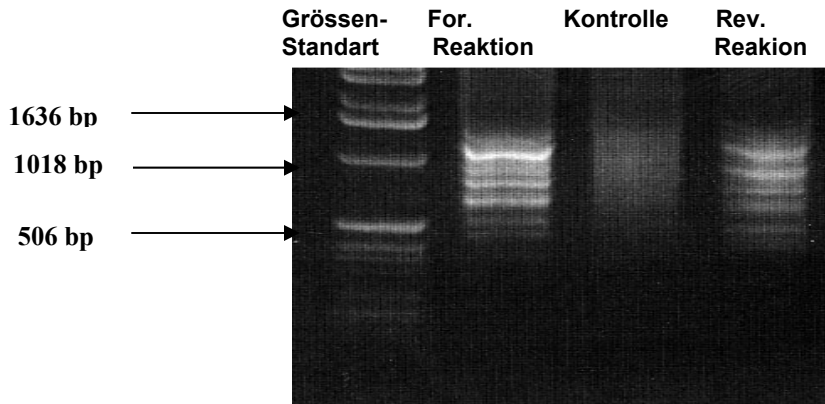
Die Isolierung der mRNA, aus je 294 µl Gesamt-RNA, wurde mit dem FastTrack® 2.0 (Invitrogen) gemacht. Es wurde die gleiche Quarzküvette wie oben beschrieben verwendet. Der Verdünnungsfaktor war bei dem Kontroll- und bei der 48-Stunden-Inokulierten Sampil 1:200 (Tabelle 2).

	260 nm	280 nm	Ratio	Konz. (µl /ml)	Verdün.-Faktor	Vol (ml)	Total (µg)
<b>Kontrolle</b>	0.091	0.056	1.75	3.45	1 : 200	1	<b>27.6</b>
<b>48h</b>	0.12	0.072	1.72	4.6	1 : 200	1	<b>36.8</b>

**Tabelle 2:** Photospektrometrische Messdaten der mRNA Isolierung

#### 3.3 PCR Select

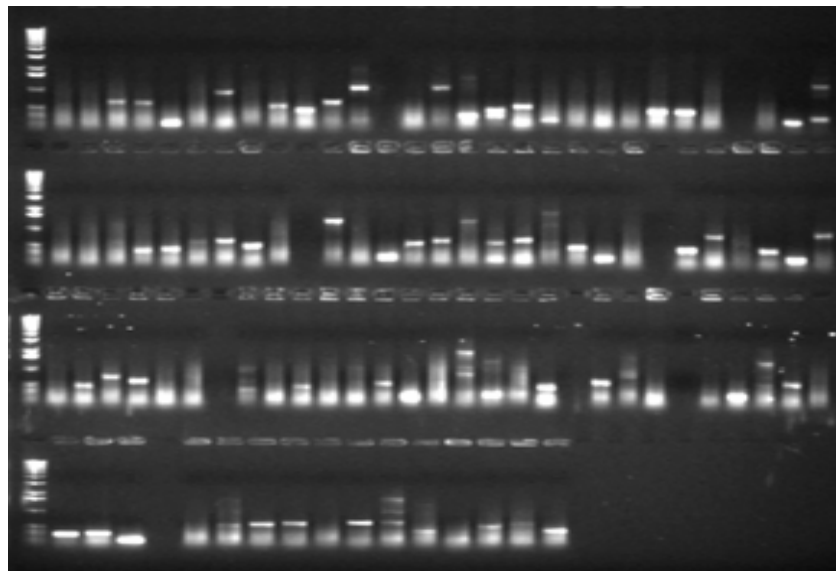
Die PCR-Select Erststrang cDNA Synthese benötigt 2 µg mRNA somit wurde für die Kontrolle (Driver) 3 µl und von 48h (Tester) 2,2 µl von der isolierten mRNA verwendet. Am Ende des PCR-Select, d.h. nach dem zweiten PCR-Schritt, wurde auf einem 2 % Agarose-Gel überprüft, ob die subtraktive Hypridisation erfolgreich verlaufen war (Abbildung 6). Die Forward Reaktion (Driver-Fraktion, die mit dem Adapter 1 ligiert worden ist) und die Reverse Reaktion (Driver-Fraktion die mit dem Adapter 2R ligiert worden ist), zeigen ein Bandenmuster, welches darauf hinweist, dass gewisse cDNA Fragmente angereichert worden sind. Demgegenüber weist die Kontrolle keine Banden auf.



**Abbildung 6:** Angereicherte cDNA-Fragmente in der Forward und Reverse Reaktion. Keine ersichtliche Anreicherung in der Kontrolle.

### 3.4 Klonierung und Southern Blot

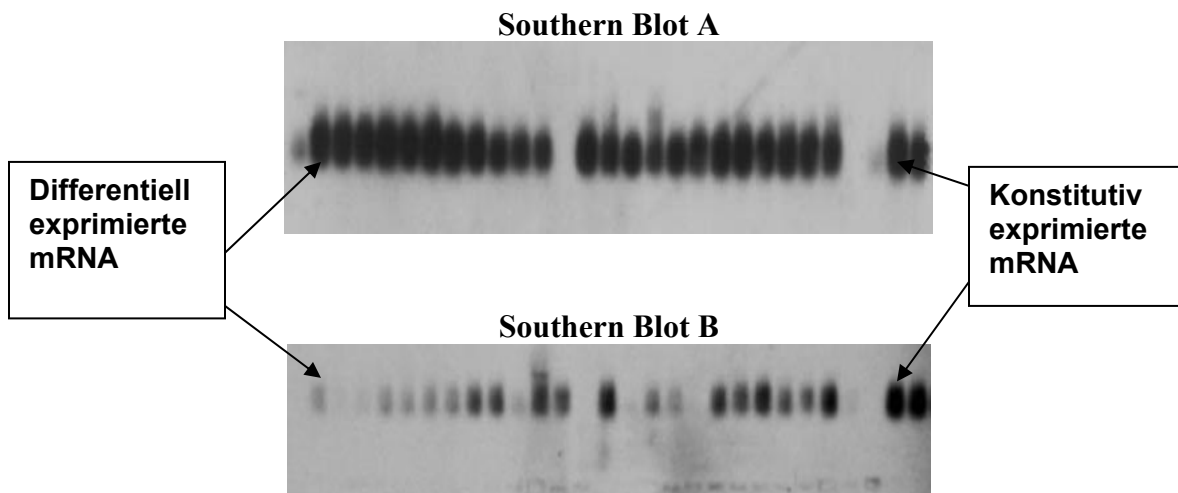
Die aus der PCR-Select gewonnenen Forward-cDNA-Fragmente wurden in den PCR XL-TOPO Vektor kloniert und in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Aus den entstanden Kolonien wurden insgesamt 1152 Klone mit einem „Kolonie-PCR“ amplifiziert. Jedes PCR-Produkt wurde dann, je zur Hälfte auf zwei 1% Agarosegel (A und B Gel) aufgetragen, sodass jedes amplifizierte DNA-Fragment auf zwei verschiedenen Gelen vorhanden war. Es wurden insgesamt 24 Gele mit je 96 Samples gemacht (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Beispiel eines Gels, mit 96 PCR-Select cDNA-Fragmente,

welche durch ein Kolonie-PCR amplifiziert worden waren.

Anschliessend wurden die Gele auf eine Nylonmembrane übertragen. Die „A-Membranen“ wurden mit radiotiven, markierten Gensonden, die aus der mRNA der Tester-Probe hergestellt worden waren, hybridisiert. Die „B-Membranen“ mit Sonden, die aus der mRNA der Driver Probe hergestellt worden waren. Bei differentiell exprimierten Genen sollte somit ein starkes Signal auf den A-Membranen und keines oder ein geringes Signal auf den B-Membranen vorhanden sein oder umgekehrt. Die durchgeführte Southern Blot Analyse ermöglichte die Auswahl derjenigen Klone, für die spätere Sequenzierung, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit, ein Insert eines differentiell exprimierten Gens enthalten. Dadurch konnte einerseits die Anzahl der zu sequenzierenden cDNA-Fragmente verringert werden und andererseits die Möglichkeit, dass konstitutive Gene gefunden werden, verringert werden (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Vergleich der unterschiedlich starken Hybridisierung der radioaktiv markierten cDNA-Fragmente, auf dem Southern Blot A, beziehungsweise B. Dies ermöglicht die Selektion derjenigen Klone, welche sich für eine spätere Sequenzierung eignen.

### 3.5 Resultat der Sequenzierung

Anhand der Southern-Blot wurden 280 Klone zum Sequenzieren ausgewählt. Nachdem 203 Klone sequenziert worden waren, wurde die Sequenzierung abgebrochen, da die gefundenen Sequenzen sich zu wiederholen schienen. Unter Verwendung des BlastN Algorithmus wurden die gefundenen Sequenzen mit bekannten Sequenzen, in der GenBank, verglichen. Die folgenden 121 Gene wurden dabei gefunden (Tabelle 3; Grafik 1).

**Tabelle 3:** Gefundene differentiell exprimierte Gene, aus 203 PCR-Select cDNA Fragmenten.

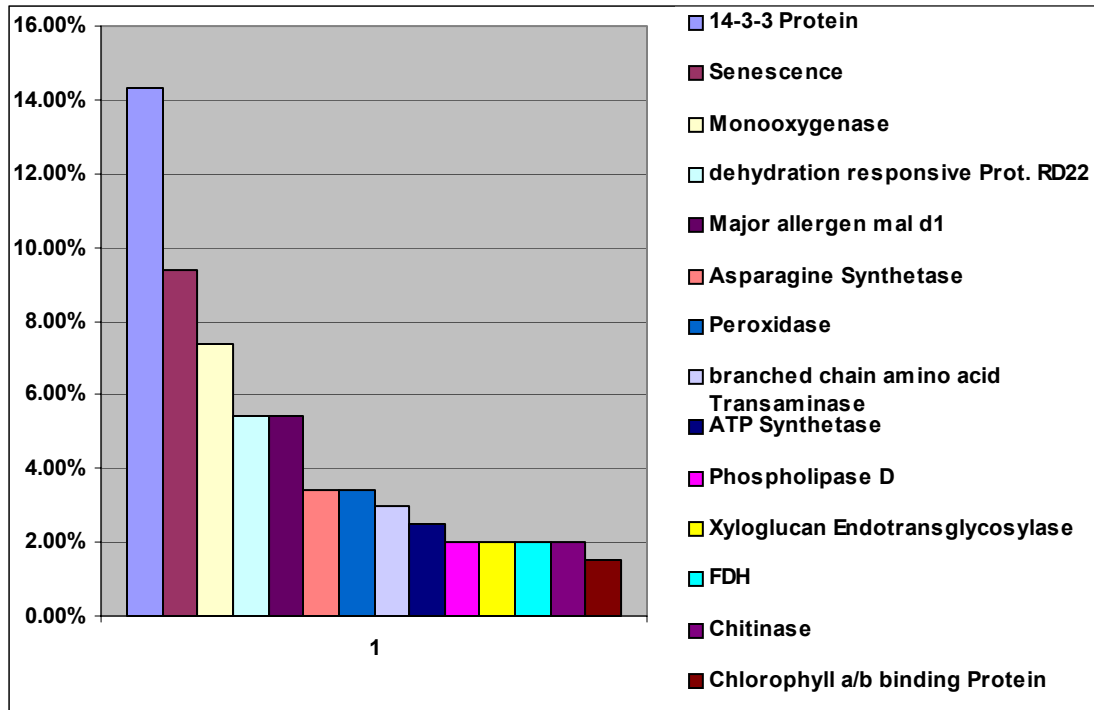
Protein	Anzahl <sup>1</sup>	in % <sup>2</sup>	Homologie <sup>3</sup>
14-3-3 Protein	29	14.30%	91 %
Senescence	19	9.40%	87 %
Monoxygenase	11	7.40%	81 %
dehydration responsive Prot. RD22	11	5.40%	84 %
Major allergen mal d1	11	5.40%	97 %
Asparagine Synthetase (ASN 2 und V)	7	3.40%	90%
Peroxidase	7	3.40%	86 %
branched chain amino acid Transaminase	6	3.00%	80 %
ATP Synthetase	5	2.50%	86 %
Phospholipase D	4	2.00%	83 %
Xyloglucan Endotransglycosylase	4	2.00%	80 %
FDH	4	2.00%	82 %
Chitinase (Klass II /V)	4	2.00%	70%
Chlorophyll a/b binding Protein	3	1.50%	89%

1) Anzahl gefundene Klone

2) Prozentualer Anteil von den total 203 gefundenen Sequenzen

3) Homologie zu der Proteinsequenz der Datenbank

**Grafik 1:** Gefundene potentiell differentiell exprimierte Gene aus 203 PCR-Select Fragmenten



### 3.6 Überprüfung der gefundenen Gene

Die aus der Sequenzierung gefundenen differentiell exprimierten Gene wurden mit Hilfe des Programs Clustalw ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) überprüft, ob die gefundenen Sequenzen vom gleichen Gen stammen. Zudem wurde überprüft, ob es sich bei den Nukleoidsequenzen eines Gens um die gleiche Gen-Familie handelt. Bei der Überprüfung konnte eine Überschneidung von Fragmenten, die zum gleichen Gen gehörten, festgestellt werden. Die Resultate wurden daraufhin bereinigt.

Bei Asparagin und Chitinase wurden je 2 verschiedene Gen-Familien gefunden.

- Asparagin Synthetase Asparagin Synthetase 2 (ASP 2)  
Asparagin Synthetase V (ASP V)

```

E7, PCR7 ASP V ACCTGGGGCTTAGAAGCCCGAGTCCATTCTGGACAAGGATTTATCAAA
D7, PCR7 ASP 2 AGGAGTGTTTTCAGGGTAAACGAAGCTAGCATTGCTCAGCATTGAATCT---
                * * * * * * * * * * * * * * * *

```

- Chitinase Chitinase Klasse II  
Chitinase Klasse V

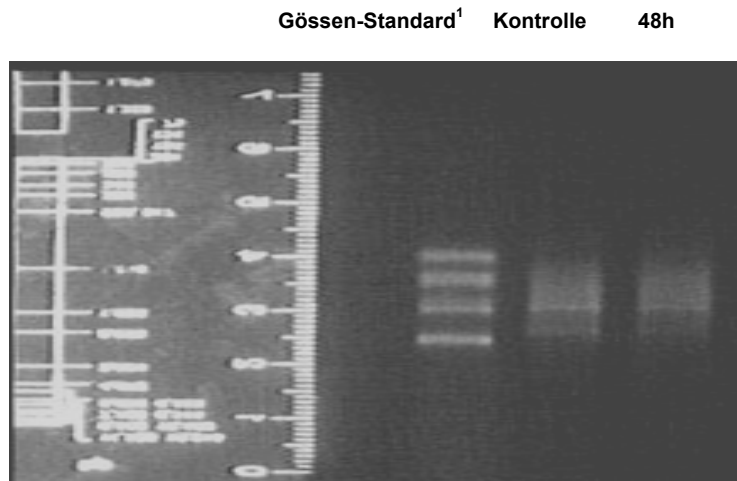
```

A7 PCR1 Chitinase V ACAACAAAAC TACCCCTTCTATTCCATATGAAAATTTTGAAC TGGATC
C4 PCR6 Chitinase II ATCGGAAGGATCTGATAAAC AACCCGGATCTAGTGGCC---ACAGACCC

```

### 3.7 Northern Blots

Um zu überprüfen ob die gefundenen Gene tatsächlich differentiell exprimierte werden, wurden mit den oben beschriebenen Genen ein Northern Blot durchgeführt. Es wurden für die Kontrolle und die 48h-Probe je 3 µg mRNA auf ein 1.2% Formaldehydgel geladen. Abschliessend wurde das Gel photographiert um zu überprüfen, dass auf der Kontrolle und der 48h-Probe die gleiche Menge mRNA vorhanden war (Abbildung 9). Dies ist wichtig, um bei der Auswertung des angehenden Northern Blot sicherzustellen, dass die Unterschiede in der Singnalstärke der hybridisierten Gensonden nicht auf unterschiedliche Mengen von mRNA, in der Kontrolle bzw. der 48-Studen-Inokulierten Probe zurückzuführen ist.



**Abbildung 9:** 1,2% Formaldehydgel, bei der Kontrolle und 48-Stunden-Inokulierten Probe sind die gleichen Mengen mRNA geladen worden.

Anschliessend wurden die Gele auf Nylonmembranen übertragen. Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten Sonden, die aus den cDNA-Fragmenten der entsprechenden Genen hergestellt worden waren, hybridisiert. Von den 14 gefunden Genen war es, in meiner zur Verfügung stehenden Zeit, nur möglich bei 4 Genen ein Northern Blot durchzuführen, welche im Folgenden im Einzelnen vorgestellt werden.

### 14-3-3 Protein

14-3-3 ist eine Protein-Familie, welche in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Die 14-3-3 Protein- Familie weist eine hohe Sequenzkonservierung auf und ist an der Regulation von diversen physiologischen Prozessen beteiligt. Wie im Northern Blot (Abbildung 10) ersichtlich ist, zeigt die 48-Stunden-Inokulierte Probe ein stärkeres Signal, als die Kontrolle, was darauf hinweist, dass durch die Inokulation von *Venturia inaequalis*, auf Florinaapfelblätter, das 14-3-3 Protein „up-reguliert“ wird. Das in der 48-Stunden-Inokulierten Probe zu sehende obere Bandenmuster könnte aufgrund alternativen Splicing oder einer unvollständigen Prozessierung der mRNA zurückzuführen sein.

**Kontrolle                      48h**





**Abbildung 10:** Northern Blot von dem 14-3-3 Protein

### Major Allergen mal d1

Mal d1 ist das Hauptallergen im Apfel. Wie durch unseren Versuch gezeigt werden kann, wird mal d1 in Apfelblätter, von der Sorte Florina, bei einer Infektion durch *Venturia inaequalis* „up-reguliert“ (Abbildung 11).

**Kontrolle 48h**

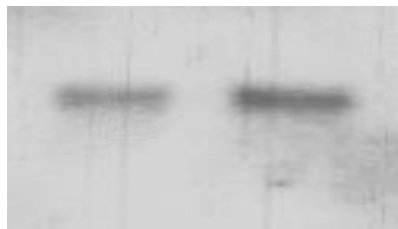


**Abbildung 11:** Northern Blot von Mal d1

### Chitinase II

Chitinase II gehören zur Klasse 3 und 4 der PR-Familie. Sie hydrolysieren Chitinpolymere, eine Komponente der Pilzzellwand. Chitinase II scheint ebenfalls durch den Befall mit *Venturia inaequalis* bei Florina Apfelblätter „up-reguliert“ zu sein (Abbildung 12).

**Kontrolle 48h**



**Abbildung 12:** Northern Blot von Chitinase II

### **Chitinase V**

Chitinase V gehören zur Klasse 3 der PR-Famillie. Ihre Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Chitinase V wird beim Befall von Apfelschorf bei Florina Apfelblätter „down-reguliert“ (Abbildung 13).

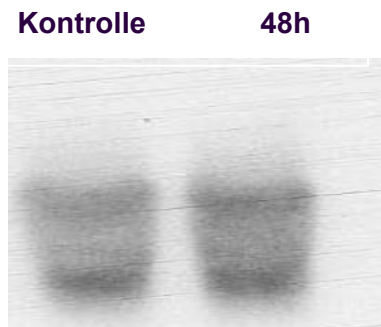


**Abbildung 13:**

Northern Blot von Chitinase V

### **Senescence-associated Protein**

Seneszenz bei Blättern bildet die letzte Phase ihrer Entwicklung und ist charakterisiert durch degradativen Prozess (Matile, 1992). Die genaue Funktion des gefunden Proteins bzw. Gens ist noch nicht bekannt. Die Expression des Proteins wird durch die Inokulation mit *Venturia inaequalis* auf Florinaapfelblätter nicht quantitativ verändert (Abbildung 14).



**Abbildung 14:**

Northern Blot von Senescence-associated Protein

## 4. Diskussion

### 4.1 Methode

**In meiner Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass sich die subtraktive Hybridisation mit dem kommerziell erhältlichen PCR-Select Kit (Clontech) für die Untersuchung von differentieller Genexpression bei Pflanzen-Pathogen-Interaktion eignet. Positive Aspekte dieser Methode sind die Anreicherung von seltenen Transkripten, während der ersten Hybridisierungsphase, sowie die relativ geringe Menge an benötigter mRNA (2 µg).**

Die dieser Methode zugrunde liegende Einschränkung, dass nur zwei RNA-Populationen miteinander verglichen werden konnten, spielt in unserer Versuchsanordnung keine Rolle, da davon ausgegangen wird, dass die Abwehrreaktion auf die Inokulation von *Venturia inaequalis* bei Florina-Apfelbäumen, innerhalb der Population, den gleichen Mechanismen folgen. Der Schwachpunkt dieser Methode liegt meiner Meinung nach bei der Ungewissheit, ob es zu einer vollständigen Hybridisierung zwischen Tester- und Driver-Population gekommen ist. Dies ist eine Bedingung, um klare Expressionsunterschiede vor und nach der Inokulation aufzufinden.

In der mir zur Verfügung gestanden Laborzeit, von dreieinhalb Monaten, wurden insgesamt 15 verschiedene Gene lokalisiert, welche durch die Inokulation von *Venturia inaequalis*, bei Florina-Apfelbäumen, potentiell, differentiell, exprimiert werden. Die abschliessende Verifizierung mithilfe eines Northern Blot konnte in der zur Verfügung stehenden Zeit nur bei insgesamt 4 Genen; Major Allergen Mal d1, Chitinase II, Chitinase V und Senescence-associated Protein, durchgeführt werden.

Unter den 4 Genen, welche durch ein Northern Blot überprüft wurden, befand sich auch das Gen für ein Seneschene-associated Protein, welches keine quantitative Unterschiede in der Expression vor und nach der Inokulation mit *Venturia inaequalis* zeigte. Dies weist darauf hin, dass die Subtraktive Hybridisation nicht hundertprozentig funktioniert hat. Das könnte einerseits an der nicht erschöpfenden Hybridisierung zwischen Tester- und Driver-Population im PCR-Select zurückzuführen sein. Andererseits, dass die Auswahl der differentiell, exprimierten cDNA-Fragmente, anhand der Southern Blots, nicht optimal verlaufen war. In der Tat waren die Southern Blot nicht sehr aussagekräftig, da es zu einer starken Anreicherung von unspezifischer Hybridisierungssignale, sowohl in den Kontroll-Membranen, wie auch in der 48-Stunden-Inokulierten-Membrane gegeben hat. Um dieses Problem bei einer möglichen Wiederholung zu vermeiden, sollten die Sonden gereinigt werden, um so zu vermeiden, dass es zu unspezifischen Hybridisierung auf den Southern Blots mit dNTP's und Primer kommt. Zudem sollte die Anzahl der Waschschrte der Stärke des radioaktiven Signals angepasst werden.

Wie in Material und Methoden schon erwähnt, wurden die Blätter, die als Kontrolle dienten, zum Zeitpunkt „0“ von Florina-Apfelbäumen, welche sich im Treibhaus befanden, entnommen. Die 48-Stunden-Inokulierten Florina-Apfelbäume wurden für 48 Stunden im Dunkeln in einer 18°C-Klimakammer unter ein Plastikzelt gestellt. Somit bestand der Unterschied zwischen der Kontroll-Probe und der 48-Stunden-Inokulierten-Probe nicht nur in den 48 Stunden Inokulation mit *Venturia inaequalis*, sondern auch durch stark unterschiedliche Umweltbedingungen wie Licht, Temperatur und

Luftfeuchtigkeit. Durch diese Unterschiede in der Versuchsanordnung wird es schwierig, die gefunden differentiell exprimierten Gene ausschliesslich dem Abwehrmechanismus gegenüber dem Pathogen zuzuschreiben.

Bei einer Wiederholung des Experiments sollten somit die Kontroll-Pflanzen ebenfalls für 48 Stunden unter Lichtausschluss in die 18°C-Klimakammer gestellt werden. Nach 48 Stunden sollten die Apfelbaumblätter mit *Venturia inaequalis* inokuliert, und sofort geerntet werden.

**Im Folgendem werden die einzelnen Gene vorgestellt.**

#### **4.2.1 14-3-3 Proteine**

14-3-3 ist eine Familie von 30kDa Proteine, welche als Homo- oder Heterodimer aktiv sind. Die in allen eukaryotischen Zellen vorkommende Familie weist ausser der C- und N-terminalen Region eine hohe Sequenzkonservierung auf (Petosa et al., 1998).

**14-3-3-Proteine sind ursprünglich identifiziert und benannt worden, als Teil einer systematischen Charakterisation von löslichen Gehirnproteine (Moore und Perez, 1967). Obwohl intensive Studien über die Funktion der 14-3-3 Proteine betrieben worden sind, (Sehnke und Ferl, 1996; Palmgren et al., 1998) bleibt ihre Funktion in vielen Fällen unklar, da sie in der Regulation von diversen physiologischen Prozessen von Mitose bis Apoptose beteiligt sind.**

**Die Haupteigenschaft aller 14-3-3 Proteine scheint die Interaktion mit anderen Proteinen zu sein. Insbesondere ist bekannt, dass gewisse Isoformen durch Pathogene (Brandt et al., 1992) und bei tiefen Temperaturen (Jarillo et al., 1994; Kidou et al., 1993), eingeschalten werden. Diese Resultate weisen darauf hin, dass die 14-3-3 Protein-Familie in den Signaltransduktionsweg involviert ist (Baunsgaard et al., 1998). Studien in Hefe haben gezeigt, dass die Aktivierung der Plasmamembrane H<sup>+</sup>-ATPase durch das Pilztoxin fusicoccin aus *Fusicoccum amygdali* durch 14-3-3 Proteine (Baunsgaard et al., 1998) moduliert wird und, dass spezifische Mitglieder der 14-3-3 Familie, nach Behandlungen mit fusicoccin, sowie während der Gen-für-Gen Resistenz-Antwort (Roberts und Bowles, 1998) induziert werden. Letztendlich wurde auch gezeigt, dass 14-3-3 Proteine mit Enzymen, welche eine potentielle Rolle in der Abwehrantwort spielen, interagieren. Dies ist der Fall bei Ascorbate-Peroxidase (Zhang et al., 1997a) und Caffeate O-Methyltransferase (Zhang et al., 1997b).**

Wie Roberts und Bowles, (1998) schon in Tomaten beschrieben haben, konnte durch ein Northern Blot (Abbildung 9) bewiesen werden, dass auch in Apfelblätter der Sorte Florina die mit *Venturia inaequalis* inokuliert worden waren, die 14-3-3 Proteine vermehrt produziert werden und für sie somit eine Rolle in der Gen-für-Gen Abwehrantwort postuliert werden kann.

#### **4.2.2 Chitinase**

Chitinasen sind Poly-Glycanohydrolasen, welche die Hydrolyse von Chitinpolymeren, ein Bestandteil der Zellwand von vielen Pilzen, katalysiert. Basierend auf ihrer Primärstruktur werden die Chitinase in 7 Klassen eingeteilt (Buchter et al., 1997).

Chitinasen gehören zu PR-Protein-Familie 3 (Chitinase I, II, IV-VII), PR-Familie 4 (Chitinase I und II), PR-Familie 8 (Chitinase III) und PR-Familie 11 (Tabak Chitinase I). Pflanzliche Chitinasen sind normalerweise kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 25-40 kDa und weisen einen hohen Grad an post-translationale Modifikationen wie Glycosylierung oder Prolyl-hydroxylation, auf (Sicher et al., 1992; Coliing et al., 1993).

**Chitinasen II sind normalerweise extrazellulär, und können im Apoplast oder im Kulturmedium von Protoplasten nachgewiesen werden (Benhaumou et al., 1990). Die Akkumulation von Klasse II Chitinase mRNA's wird durch Pathogeninfektionen und Salicylsäure-Behandlung induziert (Legrand et al., 1987). Sie haben eine antifungizide Wirkung und spielen eine mögliche Rolle in der Pflanzenabwehr, als ein Signalmolekül (Mauch et al., 1988). Die Zeit für die Chitinase Induktion ist abhängig von der spezifische Pathogen-Wirt-Interaktion und kann zwischen Minuten, bis 15-20 Stunden dauern. Der zeitliche Ablauf der Chitinase-Aktivität liegt im Bereich mehreren Tagen (Graham et al., 1994). Dieses Zeitfenster deutet darauf hin, dass die Rolle von Chitinasen in der Pflanzenabwehr hauptsächlich in der Reduktion des Pathogenwachstums und Sporulation in der späteren Krankheitsentwicklung liegt (Graham et al., 1994). Wie durch Legrand und Mauch gezeigt worden ist, scheint auch in unserem Versuch die Klasse II Chitinase „up-reguliert“ zu sein.**

Chitinase der Klasse V, welche zu den PR-Familie 3 gehört, hat eine signifikante Ähnlichkeit mit bakteriellen Exo-Chitinasen von *Bacillus circulans*. Melchers et al. (1994) konnte zeigen, dass die Chitinase V Genexpression im Tabak induziert wird, durch verschiedene Stressfaktoren, wie TMV-Infektion, Verwundung, Ethylen-Behandlung. Diese Beobachtung widerspricht den von uns gefunden Resultaten, da im Norton Blot die Chitinase der Klasse V, in Apfelblätter der Sorte Florina, bei einer Inokulation mit Apfelschorf, „down-reguliert“ zu sein scheint.

#### 4.2.3 Major Allergen mal d 1

**Das 18 kD Protein Mal d1 welches in Äpfel gefunden wurde, ist das Hauptapfel-allergen, welches Type I Allergien bei Patienten die sensitiv auf Pollen von Bäumen sind, auslöst (H. Breiteneder et al., 1989). Mal d 1 wird wegen seiner signifikanten Ähnlichkeit mit Bet v 1, das Hauptallergen von Birkenpollen zu den PR-Proteinen (PR-10) gezählt (Vanek-Krebitz et al., 1995). Durch Protein- Extraktion von verschiedenen Apfelsorten konnte gezeigt werden, dass die Mal d 1 Konzentration je nach Sorte sich stark unterscheiden (Vieths et al., 1994). So sind wurde zum Beispiel in populären Sorten, Granny Smith und Golden Delicious eine hohe Konzentration in reifen Früchten gefunden und in Sorten wie Boskoop eine geringe. Ebenfalls bekannt ist das Mal d 1 durch Pathogen-Infektion und**

### **Stressfaktoren wie längere Dunkelheits-Periode in jungen Blättern von Apfel induziert wird (H. Pühringer et al., 2000).**

Dies entspricht den von uns gefundenen Resultate das Mal d 1 durch eine Inokulation von Apfelschorf auf Florina-Apfelblätter und/oder durch eine Dunkelheitsperiode „up-reguliert“ wird.

#### **4.2.4 Senescence-associated Protein**

Seneszenz bei Blättern bildet die letzte Phase ihrer Entwicklung und ist charakterisiert durch degradative Prozesse (Matile, 1992). Unter den Senescence-associated Genen, die bis heute charakterisiert worden sind, sind Gene, die für Cysteine-Proteasen (Drake et al. 1996), RNasen (Taylor et al., 1993), und Gene, die den Glyoxylate-Pathway catalysieren, wie z.B. Malte-Synthase oder Isocitratlyase (Grahm et al., 1992), gefunden worden. Hanfrey et al., (1996) konnte zeigen, dass Pathogenesis-related Proteine auch während der natürlichen Seneszenz von *Brassica napus* exprimiert werden. Ebenso ist bekannt, dass die Seneszenz von Blätter induziert wird wenn sie in die Dunkelheit überführt werden (Biswal und Biswal, 1984). Der genaue Mechanismus und die Regulation der Seneszenz sind noch nicht voll verstanden. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, wenn man die grosse Zahl von Enzymen bedenkt, die in den Degradations-Prozessen und in Stressreaktionen involviert sind (Klerber-Janke und Krupinska, 1996). In unserem Versuch konnte nicht bewiesen werden, dass durch die Infektion von *Venturia inaequalis*, bei Florinaapfelblättern, es zu einer differentiellen Expression von Senescence-associated Protein kommt. Der entsprechende Northern Blot (Abbildung 13) weist eher darauf hin, dass es keine Unterschiede in der Expression des Senescence-associated Protein vor und nach der Behandlung gibt.

**Die Überprüfung der folgenden potentiell differentiell exprimierten Gene konnten infolge Zeitmangels nicht durchgeführt werden.**

#### **4.2.5 Asparagin-Synthetase (ASN)**

Es wird allgemein angenommen, dass die Asparagin-Synthetase, in höheren Pflanzen, hauptsächlich Glutamin-abhängig ist (Siciechowicz et al., 1988; Shi et al 1997). Dabei werden Asparagin und Glutamt aus Aspartat und Glutamin, unter Verbrauch von ATP gebildet. Die Instabilität des Enzyms und geringe Aktivität der Asparagin-Synthetase in Pflanzen erschweren bei vielen Pflanzen-Arten die Messung der Asparaginsynthetase-Aktivität (Siciechowicz et al., 1988). Daher sind die Eigenschaften der pflanzlichen Asparagin-Synthetase bisher nur wenig bekannt. Die Expression der pflanzlichen Asparaginsynthetase wird ähnlich wie bei der Nitratreduktase und Glutaminsynthetase durch Licht und Metabolite reguliert (Lam et al., 1998). Unter gewissen Bedingungen, wie langen Dunkelperioden, Kohlenstoff-Limitation und Umweltstress, steigt der Asparaginspiegel in der Pflanze an (Lohaus et al., 1998). Asparagin-Synthetase 2 beinhalten eine Pur-F Typ Glutamin-bindende Dreiergruppe, was darauf hinweist, dass es ein Glutamin-abhänge, Asparagine, Synthetase Isoenzym ist (Lam et al., 1998). ASN2 wird im Gegensatz zu ASN1 durch Licht und/oder Saccarose-Behandlung in *Arabidopsis thaliana*, induziert (Lam et al., 1998). Entsprechend der gefundenen Literatur scheint

Asparagin-Synthetase eher durch den Umweltfaktor Licht, als durch die Pathogeninfektion in Florinaapfelbäumen differentiell exprimiert zu werden.

#### **4.2.6 Formate dehydrogenase (FDH)**

Formate Dehydrogenase ist eine Komponente des C<sub>1</sub> Metabolismus, in Pflanzen. Es katalysiert die NAD<sup>+</sup>-abhängige Oxidation von Formate zu CO<sub>2</sub>. Das Enzym kommt vor allem in den Mitochondrien von nicht-grünen Geweben vor (Colas et al., 1993). Man findet es aber auch in grünen Blättern, jedoch in weitaus geringeren Mengen (Oliver, 1981; Hourton-Cabassa et al., 1998; Bonham-Smith et al., 2001). FDH wird in Kartoffel- und *Arabidopsis thaliana* Blätter, bei Blattapplikation mit Methanol, Formate und Formaldehyde (Fukusaki et al., 2000) induziert. Das FDH Transkript wird ebenfalls stark in Blätter induziert, bei Dunkelheit und unter Umweltstress, wie Verwundung Hitze und Kälte (Olson et al., 2000). Wie bei ASN scheint auch bei der Formate Dehydrogenase die Induktion in den Apfelblättern eher auf Umweltfaktoren, als auf die Infektion mit *Venturia inaequalis* zurückzuführen zu sein.

#### **4.2.7 Branched chain amino acid Transaminase (BCATs)**

BCATs spielen eine entscheidende Rolle in dem Metabolismus von Leucin, Isoleucin und Valin. Sie katalysieren den letzten Schritt der Synthese und/oder den ersten Schritt des Abbaus von dieser Klasse von Aminosäuren (Lea und Ireland, 1999). Biosynthesewege von branched-chain Aminosäuren wurden intensiv in Pflanzen untersucht, da verschiedene, wichtige Herbizide in diesen Syntheseweg eingreifen. (Wittenbach und Abell, 1999). In *Arabidopsis* wurden 7 BCAT Gene identifiziert, welche entweder im Chloroplast oder in den Mitochondrien lokalisiert waren (Diebold, 2002). Durch die Mikroarray-Technik konnte Schenk et al., (2000) zeigen, dass BCATS in *Arabidopsis thaliana*, nach einer Behandlung mit Salicylsäure „up-reguliert“ werden. Anhand dieser Informationen ist es schwierig eine Aussage zu machen, über eine mögliche Involvierung von branched chain amino acid Transaminase, in der Pflanzenabwehr-Reaktion.

#### **4.2.8 Peroxidase**

Peroxidase katalysiert den Abbau von Pectinase, welche von Pilzen ausgeschieden wird, um die pflanzliche Zellwand abzubauen. Peroxidase bilden eine Superfamilie von weit verbreiteten Genprodukten, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz-ähnlichkeiten, in Isogen-Familien eingeteilt werden (Tyson, 1992; Ross et al., 1995).

Die Aktivierung von pflanzlichen Peroxidase-Genen findet vermutlich sehr früh nach dem Befall der Pflanzen mit Pathogenen statt. Peroxidasen spielen auch bei der Lignifizierung (Walter, 1992), der Verknüpfung von Zellwandproteinen (Bradley et al., 1992), der Wundheilung (Scherf et al., 1993) sowie bei der Produktion von antimikrobiellen Radikalen (Peng und Kuc, 1992; Kobayashi et al., 1994) eine entscheidende Rolle. Sehr wahrscheinlich spielt die Peroxidase auch im System *Malus domestica* cv *Florina* – *Venturia inaequalis* eine wichtige Rolle im Pflanzenabwehr-mechanismus.

#### **4.2.9 Xyloglucan Endotransglycosylase (XET)**

Das Enzym XET, ist bei der Bildung und dem Abbau von Xyloglucanpolymere beteiligt. XET ist eine Schlüsselkomponente bei der Regulation von Zellwand-Expansion und bei der Eingliederung von neuem synthetisiertem Xyloglucan, in die Zellwandmatrix (Darly et al., 2001). XET spielt auch eine Rolle bei Zellwandabbau-Prozessen, wie Abscission oder die Reifung von Früchten. Gemäss seiner Rolle im Aufbau und der Modifikation der Zellwand findet man das Enzym vor allem in wachsenden Geweben, wie in Blättern und Wurzeln (Vosseberg et al., 2000). XET wird in Blättern bei Wasserstress und bei mechanischem Stress (Bacon, 1999) aktiviert. Ob es sich bei XET um ein Artefakt des PCR-Select handelt oder ob das Gen tatsächlich bei einer Infektion mit Apfelschorf, bei der Sorte Florina, differentiell exprimiert wird, kann erst durch ein Northern Blot abschliessend geklärt werden.

#### **4.2.10 Dehydration responsive Protein RD22**

RD22 ist ein Mitglied der BURP domain-containing Protein-Familie. Diese Domäne wurde bis heute nur in Pflanzenproteinen gefunden. BURP domain-containing Proteine bestehen im allgemeinen aus drei oder vier verschiedenen Modulen; eine N-terminale hydrophobische Domäne, eine Transit-Peptid, ein optionales Segment aus repetitiven Elementen und die C-terminale BURP Domäne (Hattori et al., 1998). Die Expression von RD22 Transkripte wird im Blatt von *A. thaliana* induziert, durch Dehydration und exogene Stressfaktoren, wie hohe Salzkonzentration (Jamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1993). Die Induktion von RD22-Proteinen wird durch ABA vermittelt (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Zudem ist bekannt, dass das Dehydrations-responsive-Protein, bei Verwundung oder Pathogenbefall induziert wird (Pozueta-Romero et al., 1999). RD22 scheint ebenfalls ein vielversprechender Kandidat bei der Pathogenabwehr in Äpfelbäumen zu sein.

#### **4.2.11 Chlorophyll a/b binding Protein (CAB Proteine)**

Die CAB Proteine der höheren Pflanzen und Grünalgen sind integrale Membranproteine, welche Chlorophyll a und b und oft auch Xanthophylls binden können. Sie fangen die Solarenergie auf und leiten sie in die Reaktionszentren des Photosystems I und II. Eine weitere wichtige Funktion ist der Schutz vor zu starkem Licht. Durch die Mikroarray-Technik konnte Schenk et al., (2000) zeigen, dass CAB Proteine in *Arabidopsis thaliana*, nach einer Behandlung mit Salicylsäure, „up-reguliert“ werden. Ob neben der Induktion von Cab-Genen durch Salicylsäure auch eine Abwehrantwort gegen pathogene Pilze eine differentielle Expressierung von CAB Proteinen auslöst, geht aus der Literatur nicht hervor.

#### **4.2.12 Phospholipase D**



Phospholipide bilden nicht nur ein Hauptbestandteil der Zellmembrane sondern sind meist auch der Ausgangspunkt für die Generierung von zellularen Regulatoren. Die Hydrolyse von Phospholipide durch Phospholipasen ist meist der erste Schritt bei der Synthese von Lipiden und lipid-abgeleiteten Botenstoffen. Die Aktivierung von Phospholipase D ist verbunden mit verschiedenen Signalprozessen in der Pflanze, wie Stress-Antwort (Wang, 2001). Phospholipase D ist auch an der Pflanzen-Pathogen Interaktion beteiligt. So sind PLD an der Regulation des „oxidativen-burst“ beteiligt (Young, 1996). Nach diesen Informationen scheint die Phospholipase D tatsächlich an der Resistenzreaktion beteiligt zu sein.

#### **4.2.13 ATP-Synthetase**

**Die Kooperation der Elektronentransport-Kette mit der ATP Synthetase führt zur oxidativen Phosphorylierung von ADP zu ATP. Die ATP-Synthetase hat eine protonenleitende Einheit F<sub>0</sub> und eine katalytische Einheit F<sub>1</sub>. Die durch den Elektronentransport ins äußere Medium gepumpten H<sup>+</sup>-Ionen fließen durch den protonenleitenden Kanal (F<sub>o</sub>) im ATP-Synthetasmolekül wieder in die**

**Mitochondrienmatrix zurück, wobei der Konzentrationsgradient die treibende Kraft ist. Die durch diesen Rückfluss durch das ATP-Synthetasmolekül freigesetzte Energie bewirkt die gekoppelte Synthese von ATP aus ADP und Phosphat. Es konnte in der Literatur kein Hinweis dafür gefunden werden das ATP-Synthetase an Pflanzen-Pathogen-Interaktion beteiligt ist.**

#### **4.2.14 Monooxygenase**

Monooxygenasen werden, bezüglich des an der Sauerstoff-Aktivierung beteiligten Kofaktors, in zwei grosse Gruppen eingeteilt: A) Die Monooxygenasen mit einem redox-aktiven, organischen Kofaktor, der direkt an der Sauerstoff-Aktivierung und Substrat-Hydroxylierung beteiligt ist. B) Die Metall-abhängigen Monooxygenasen, die molekularen Sauerstoff über Metallatome im katalytischen Zentrum aktivieren. Auch bei der Monooxygenase kann kein ersichtlicher Zusammenhang zwischen diesem Enzym und der Pflanzen-Pathogen-Interaktion hergestellt werden.

## 5. Ausblick

Zur weiteren Aufklärung der gefundenen 15 Genen sollte man die ganze Gensequenz von den entsprechenden Genen aus *Malus domestica cv Florina* bestimmen und falls sie noch nicht in der Gendatenbank erfasst sind, in die Datenbank eintragen lassen.

Interessant wäre auch die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Genexpression, der von uns gefundenen Genen. Dies könnte erreicht werden, indem ein weiteres Mal Florinaapfelbäume mit *Venturia inaequalis* inokuliert würden und dann zu verschiedenen Zeitpunkten, z.B. alle 6 Stunden, die mRNA aus den Blättern zu isolieren und mithilfe eines Northern Blot die Expressionsstärke zu bestimmen.

Eine weitere interessante Möglichkeit das Experiment weiterzuführen wäre die gefundenen differentiell exprimierten Gene in einem anderen System, z.B. die Inokulation von Golden Delicious mit *Venturia inaequalis* oder die Verwendung eines anderen Pathogens zu testen.

## 6. Literatur

**Bacon Mark A.**, (1999). The biochemical control of leaf expansion during drought; *Plant Growth Regulation* 29; 101-112

**Bantigneies B., Seguin J., Muzac I., Dedaldechamp F., Gulick P. und Ibrahim R.**, (2000). Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like Protein, *Plant Mol Biol* 42, 871-881

**Baunsgaard L., Fuglsang A., Jahn T., Korthout HA., de Boer AH., Palmgren M.**, (1998). The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. *The Plant Journal* 13, 661–671

**Becker H.**, (1993). *Pflanzenzüchtung*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, pp 1-327

**Beerhues L. und Kombrink E.**, (1994). Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase und 1,3-beta-glucanase in potato. *Plant Mol Biol* 24, 353-367

**Bell A.**, (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annu. Rec. Plant Physiol.* 32, 21-81

**Benhamou N., Joosten M and DeWit.**, (1990). Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissue infected by *Fusarium*. *Plant Physiol* 92;1108-1125

**Benhaumou N.**, (1996). Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends in Plant Science* 1, 233-240

**Biswal U., Biswal B.**, (1984). Photocontrol of leaf senescence. *Photochem Photobiol* 39: 875±879

**Bradley D. J., Kjellbom P., Lamb C. J.**, (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative crosslinking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21-30.

**Brandt J., Thordal-Christensen H., Vad K., Gregersen P., Collinge D.**, (1992). A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator. *The Plant Journal* 2, 815–820

**Breiteneder H., Pettenburger K., Bito A., Valenta R., Kraft D., Rumpold H., Scheiner O. and Breitenbach M.**, (1989). The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8 (1989), pp. 1935–1938

**Cassab G. and Varner J.E.**, (1988). Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 321-353

**Chae Y., Fischbeck G.**, (1979). Genetic analysis of powdery mildew resistance in wheat cultivar Diplomat. *Z Pflanzenzüchtung* 83: 272-280

**Constabel C., Bertrand C. und Brisson N.**, (1993). Transgenic potato plants overexpressing the pathogenesis-related STH-2 gene show unaltered susceptibility to *Phytophthora infestans* und potato virus X. *Plant Mol Biol* 22, 775-782

**Côté F. and Hahn M.**, (1994) Oligosaccharines: structures and signal transduction. *Plant Mol. Bio.* 26, 1379-1411

**Creamer J.R. and Bostock R.**, (1986). Characterization and biological activity of *Phytophthora infestans* phospholipids in the hypersensitive response of potato tuber. *Physio. Mol. Plant Pathol.* 28, 215-225

**Darley C.P., Forrester A.M. und McQueen-Mason, S.J.** (2001). The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol. Biol.* 47, 179-195

**De Wit P. and Spikman G.**, (1982). Evidence for the occurrence of race- and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interaction, *Physiol. Plant Pathol.* 21, 1-11

**Delp G. und Palva E.**, (1999). A novel flower-specific Arabidopsis gene related to both pathogen-induced and developmentally regulated plant  $\beta$ -1,3-glucanase genes. *Plant Mol Biol* 39, 565-575

**Diebold R., Schuster J., Daschner K., Binder S.**, (2002). The branched-chain amino acid transaminase gene family in Arabidopsis encodes plastid and mitochondrial proteins. *Plant Physiol.* Vol. 129(2):540-50.

**Dirlewanger E., Isaac P.G., Ranade S., Belajouza M., Cousin R., de Vienne D.**, (1994). Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. *Theor Appl Genet* 88: 17-27

**Dixon R., Harrison M. and Lamb C.**, (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 479-501

**Dixon R.A. and Paiva N.**, (1995). Stress-induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097

**Drake R., John I., Farrel A., Cooper W., Schuch W. and Grierson D.**, (1996). Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* 30, pp. 755–767.

- Drake R., John I., Farrell A., Cooper W., Schuch W., Grierson D.,** (1996). Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol Biol* 30: 755±767
- Flor H.H.,** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296
- Fukusaki E.I., Ikeda T., Shiraishi T., Nishikawa T. and A. Kobayashi A.,** (2000). Formate dehydrogenase gene of *Arabidopsis thaliana* is induced by formaldehyde and not by formic acid. *J. Biosci. Bioeng.* 90 pp. 691–693.
- Gan S. and Amasino R.,** (1997). Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol.* 113, pp. 313–319.
- Garcia-Ollmedo, f., Molina, A., Alamillo, J.-M. und Rodriguez-Palenzuela,** (1998). Plant Defense Peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* 47, 479-491
- Graham I.A, Leaver C., Smith S.,** (1992). Induction of malate synthase gene expression in senescent and detached organs of cucumber. *Plant Cell* 4: 349±357
- Graham L.S. and Sticklen M.,**(1994). Plantchitinases. *CanJ. Bot.* 72:057-1083
- Hahlbrock K. and Scheel D.,** (1987) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40, 347-369
- Hahlbrock K. and Scheel D.,** (1989). Physiologi and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40, 347-369
- Hanfrey C., Fife M., Buchanan-Wollaston V.,** (1996). Leaf senescence in Brassica napus: Expression of genes encoding pathogenesis related proteins. *Plant Mol Biol* 30: 597±609
- Hannond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.** (1997) Plant Disease Resistance Genes *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 575-607
- Hanson A.D. and S. Roje,** (2001) One-carbon metabolism in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, pp. 119–137.
- Hanson A.D., Gage D.A. and Y. Shachar-Hill,** (2000). Plant one-carbon metabolism and its engineering. *Trends Plant Sci.* 5, pp. 206–213
- Herrmann K.M.,** (1995). The Shikimate Pathway: Early steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* 7, 907-919

- Hourton-Cabassa C., Ambard-Bretteville F., Moreau F., J. Davy de Virville, R. Rémy and C. Colas des Francs-Small,** (1998). Stress induction of mitochondrial formate dehydrogenase in potato leaves. *Plant Physiol.* 116, pp. 627–635.
- J. Hattori, K. A. Boutilier, M. M. van Lookeren Campagne Miki B.L.,** (1997). A conserved BURP domain defines a novel group of plant proteins with unusual primary structures, *Mol Gen Gent* 259; 424-428
- Jarillo J., Capel J., Leyva A., Martinezzapater J., Salinas J.,** (1994). Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Molecular Biology* 25, 693–704
- Keller M., Schachermayr G., Winzeler M., Messmer M.M.,** (1999). *Teor. Apple Genetic* 98:903-912
- Kidou S., Umeda M., Kato A., Uchimiya H.,** (1993). Isolation and characterization of a rice cDNA similar to the bovine brain-specific 14-3-3 protein gene. *Plant Molecular Biology* 21, 191–194
- Klerber-Janke T., Krubinska K.,** (1997). Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions. *Planta* 203: 332-340
- Kobayashi I.,** (1995). Cell biology of early events in the plant resistance response to infection by pathogenic fungi. *Can J. Bot.* 73, 418-425
- Kolmer J.A.,** (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu Rev Phytopathol* 34: 435-455
- Kombrink E. und Somssich I.E.,** (1995). Pathogenesis-related proteins and plant defense. In *Plant Relationships*, 6 (Carroll, G. and Tudzynski, P., eds). Berlin, Springer-Verlag, 107-128
- Krieg, Paul A.,** (1996). *A Laboratory Guide to RNA; Isolation, Analysis und Synthesis*, Wiley-Liss, Inc. New York, USA
- Lam H.M., Hsieh M.H. and Coruzzi G.,** (1998). Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16:345-353.
- Lam Hon-Ming, Hsieh Ming-Hsiun, Coruzzi Gloria,** (1998). Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* V 16, Page 345-354
- LAMB C. und DIXON R.A.,**(1997), The oxidative burst in plant disease resistance *Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Pathology*, 48,251-275

**Legrand M., Kaufmann S., Geoffroy P., Friting B.,** (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6750±6754

**Leslie R. A. and Robertson H.,** (1992). *Differential Display, a practical approach*, Oxford University Press 89-90

**Li R., Bonham-Smith P.C. and J. King,** (2001). Molecular characterization and regulation of formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Can. J. Bot.* 79 (2001), pp. 796–804.

**Lindhout P.,** (2002). The perspective of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* 124: 217-226

**Liu, D., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M. and Bressan, R. A.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1888–1892.

**Lohaus G., Büker M., Hußmann M., Soave C., Heldt H.W.,** (1998). Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagine in the Illinois Low Protein and Illinois High Protein strains of maize *Volume 205, Issue 2, pp 181-188 Planta*

**Peinado M.,** (1998). Analysis of differential gene expression in human colorectal tumor tissues by RNA arbitrarily primed-PCR: a technical assessment. *Lab Invest*, 78, 309-317.

**Mansfield J.,** (1986). Recognition, elicitors and the hypersensitive reaction. Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions (ED.: Lugtenberg, B.), Springer-Verlag, Berlin, 433-437

**Mathieu-Daude F., Welsh J., Vogt T. and McClelland M.,** (1996a). DNA rehybridization during PCR: the 'Cot effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res.*, 24, 2080-2086.

**Matile P.,** (1992). Chloroplast senescence. In: Baker N, Thomas H (eds) *Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants* Elsevier, Amsterdam, pp 413±440

**Mazau D. and Esquerré-Tugayé M.T.** (1986) Hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in the cell wall of plants infected by various pathogens. *Phyiol. Mol. Plant Pathol.* 29, 147-157

**McClelland M., Mathieu-Daude F., and Welsh J.,** (1995). RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet.*, 11, 242-246.

**Melcher L. S., Apotheker-de Groot M., van der Knaap J., Ponstein A., Sela-Buurlage M., Bol J., Ben J.C., Cornelissen B., van den Elzen P. and Linthorst**

**H.**, (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity *The Plant Journal* Volume 5 Issue 4 Page 469

**Moore B.W., Perez V.J.**, (1967). Specific acidic proteins of the nervous system. In: Carlson F.D., ed. *Physiological and biochemical aspects of nervous integration*. Woods Hole: Prentice Hall, 343–359

**Nooden L., Guamet J.J. and John I.**, (1997). Senescence mechanisms. *Physiol. Plant.* 101, pp. 746–753.

**Noradi R., Tsai S., Gilbertson R.**, (1993). Toward an integrated linkage map of common bean, 3. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* 134: 341-350

**Oliver D.J.**, (1981). Formate oxidation and oxygen reduction by leaf mitochondria. *Plant Physiol.* 68, pp. 703–705.

**Olson B.J., Skavdahl M., Ramberg H., Osterman J.C. and Markwell J.**, (2000). Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: characterization and possible targeting to the chloroplast. *Plant Sci.* 159, pp. 205–212.

**Pariasca J.A., Miyazaki T., Hisaka H., Nakagawa H., Sato T.**, (2000). Effect of modified atmosphere packaging (MAP) and controlled atmosphere (CA) storage on the quality of stored snow pea pods (*Pisum sativum* L. var. *saccharatum*). *Postharvest Biol. Technol.* 21, 213–223

**Paxton J.**, (1982). Phytoalexins. In *active Defense Mechanisms in Plants* (Wood, R. K.S., eds). Plenum, New York, pp. 344-346

**Penc M. und Kuc J.**, (1992). Peroxidase generated hydrogen peroxide as source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82: 696-699.

**Ponstein, A. P., Bres-Vloemans, S. A., Sela-Buurlage, M. B., van den Elzen, P. J. M., Melchers, L. S. and Cornelissen, B. J. C.**, *Plant Physiol.*, 1994, 104, 109–118.

**Pozeuti-Romero J., Klein Houne., Schantz M., Meyer B.**, (1995). Characterization of a family of genes encoding a fruit-specific wound-stimulated protein of bell pepper. *Plant Mol Biol* 28: 1011-1025

**Prell H. H.**, (1996). *Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

**Pühringer H., Moll D., Hoffman-Sommergruber K., Watillon B., Katinger H., Laimer da Câmara Maccado M.**, (2000). The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible, *Plant Science* 152



- Roberts M., Bowles D.,** (1999). Fusicoccin, 14-3-3 proteins and defense responses in tomato plants. *Plant Physiology* 119, 1243–1250
- Ross H.F.,** (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14, 329-339
- Sambrook , Russel D.W.,** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Aderson J., Rochomd T.,**(2000). Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed my microarray analysis, *Plant Biology* vo. 97 11655-11660
- Scherf B. A., Bajar A. M., Kolattukudy P. E.,** (1993). Abolition of an inducible highly anionic peroxidase activity in transgenic tomato. *Plant Physiol.* 101: 201-208.
- Schlumbaum A., Mauch F., Vögeli U.,** (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324, 365-367
- Schmelzer E., Naton B., Freytag S., Rouhara I., Kuester B. and Hahlbrock K.,** (1995). Infection-induced rapid cell death in plants: A means of efficient pathogen defense. *Canadian J. of Botany* 73, 426-434
- Schuler T., Poppy G., Kerry B.R. und Denholm I.,** (1998). Insect-resistant transgenic plants. *Tibtech* 16, 168-175
- Sehnke P., Ferl R.,** (1996). Plant metabolism: enzyme regulation by 14-3-3 proteins. *Current Biology* 6, 1403–1405
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.,** (1997). Molecular responses to drought stress. In *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. TX: RG Landes 1993, 11-28
- Shoemaker D., Schadt E., Armour Y., Garrett-Engele P., McDonagh P., Loer M.,** (2001). Experimental annotation of the human genome using microarray technology, *Nature* Volume 409 Number 6822 Page 922 - 927
- Sieciechowicz K.A., Joy K.W., Ireland R.J.,** (1988). The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry* 27:663-671
- Taylor C.B., Bariola P.A., DelCardayre S., Raines R., Green P.,** (1993). RNS2, a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-Rnases before speciation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5118±5122

**Tomiyama K., Doke N., Nozue N. and Ishigui T.,** (1979). The hypersensitive response of resistant plants. In: Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interactions (Eds.; Daly, J.M. and Ceritani, I.) Plant Pathol, 12, 3-23

**Tortola S., Capella G., Marcuello E., Gunther K., Aiza G., Masramon L., Raymond Tyson H.,** (1992). Relationship among amino acid sequences of animal, microbial, and plant peroxidases. *Theor. Appl. Genet.* 84: 643-655

**Van der Planck J.E.,** (1963). Plant disease epidemics and control. Academic Press New York, pp 1-349

**Vanek-Krebitz M., K. Hoffmann-Sommergruber, M. Laimer Da Camara Machado, M. Susani, C. Ebner, D. Kraft, O. Scheiner and H. Breiteneder,** (1995). Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*) and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, pp. 538–551

**Vieths S., Jankiewicz A., Schöning B., Aulepp H.,** (1994). Allergy 49, 262-271

**Vissenberg K., Fry, S.C., and Verbelen, J.P.,** (2001). Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 127, 1125-1135

**Walter M. H.,** (1992). Regulation of lignification in defense. Pages 327-352 in: *Genes involved in plant defense*. T. Boller and F. Meins, eds. Springer-Verlag, New York

**Wang C.S., Hunag J.C. und Hu J.H.,** (1999). Characterization of two subclasses of transduction pathways. *Plant Mol Biol* 40, 807-814

**Wang X.,** (2001). Plant Phospholipases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 211-231

**[Watanabe](#) A., Hamada K., Yokoi H. and Watanabe, A.,** (1994). Biphasic and differential expression of cytosolic glutamine synthase genes of radish during seed germination and senescence of cotyledons. *Plant Mol. Biol.* 54, pp. 476–492.

**Watson I.A.,** (1970). Changes in virulence and population shifts in plant pathogens. *Ann Rev Phytopath* 8: 209-230

**Welsh J. and McClelland M.,** (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 7213-7218

**Young S., Wang X. and Leach J.,** (1996). *Plant Cell* 8, 1079-1090

**Zhang H., Wang J., Goodman HM., (1997a).** An *Arabidopsis* gene encoding a putative 14-3-3-interacting protein, caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1353, 199–202

**Zhang H., Wang J., Nickel U., Allen RD., Goodman HM., (1997b).** Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology* 34, 967–971

## **7. Danksagung**

Ich danke Cesare Gessler, Andrea Patocchi und Chiara Toller für die interessante Diplomarbeit und die aufmerksame Betreuung. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Gruppe Phytopathologie, die mich nach Kräften unterstützt hat.

## 8. Anhang

Masterplate 1 und 2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1 PCR1	D6 PCR 1	C11 PCR 1	A5 PCR 3	F3 PCR 3	A8 PCR 5	A9 PCR 5	C3 PCR 6	C4 PCR 6	G9 PCR7	A1 PCR1	C2 PCR 10
B	E8 PCR 10	C5 PCR 11	C6 PCR 11	A5 PCR2								

Klon-Nr.	Protein
A1 PCR1	Chitinase V
D6 PCR 1	Mal d1
C11 PCR 1	Formate Dehydrogenase
A5 PCR 3	Xyloglucan Endotransglycoylase
F3 PCR 3	Asparagine Synthetase 2
A8 PCR 5	Pospholipase D
A9 PCR 5	Dehydration-responsive Protein RD 22
C3 PCR 6	Peroxidase
C4 PCR 6	Chitinase II
G9 PCR7	Chlorophyll a/b binding Protein
A1 PCR1	Senescence
C2 PCR 10	Branched-chain-amino-acid Transaminase-like-Protein
E8 PCR 10	14-3-3 Protein
C5 PCR 11	Asparagin Synthetase
C6 PCR 11	ATP Synthase
A5 PCR2	Monooxygenase